Untersuchungen zur Semisynthese von Clostridienferredoxin und Pferdemyoglobin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Ilse Jahns, geb. Zartner
aus Ulm

1975

1974

75 57

Untersuchungen zur Semisynthese von Clostridienferredoxin und Pferdemyoglobin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Ilse Jahns, geb. Zartner
aus Ulm

1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	26.November 1974
Dekan:	Prof.Dr.E.Lindner
1. Berichterstatter:	Prof.Dr.H.Hagenmaier
2. Berichterstatter:	Prof.Dr.W.Voelter

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1970 bis August 1973 unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. H. Hagenmaier

im Chemischen Institut der Eberhard-Karls- Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. H. Hagenmaier

danke ich aufrichtig für die Themenstellung, eine große Zahl von Anregungen, sein stetes Interesse und die hochherzige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Ernst Bayer danke ich für seine großzügige Förderung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0050

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Allgemeiner Teil	9
2.1.	Untersuchungen zur Semisynthese von Ferredoxin	9
2.1.1.	Einführung, spezielle Problematik und Synthesestrategie	9
2.1.2.	Isolierung von Ferredoxin	15
2.1.3.	Untersuchungen über die Darstellungsmöglichkeiten von Apoferredoxin	21
2.1.3.1.	Darstellung mit Hilfe von Eisenkomplexbildnern	21
2.1.3.2.	Darstellung mit Hilfe von Mersalylnatrium	22
2.1.3.3.	Darstellung mit Hilfe von Trichloressigsäure	25
2.1.4.	Reversible Blockierung der Cystein-SH-Gruppen	29
2.1.4.1.	S-Sulfonierung der Apoferredoxine	33
2.1.5.	Darstellung von natürlichen Fragmenten	38
2.1.6.	Resyntheseversuche	41
2.1.7.	Der Einfluß von Bromwasserstoff, Trifluoressigsäure und Fluorwasserstoff auf die Resynthesefähigkeit von Apoferredoxin	44
2.1.8.	Ergebnisse	45

2.2.	Untersuchungen an Myoglobin	47
2.2.1.	Einführung, spezielle Problematik und Synthesestrategie	47
2.2.2.	Untersuchungen zur Verwendung von Schutzgruppen	56
2.2.2.1.	Aminoschutzgruppen	56
2.2.2.1.1.	Einführung der Trifluoracetylgruppe	56
2.2.2.1.2.	Abspaltung der Trifluoracetylgruppe	58
2.2.2.2.	Carboxylschutzgruppen	63
2.2.2.2.1.	Einführung des Benzylesters mit Phenyldiazomethan	63
2.2.2.2.2.	Einführung des Benzylesters mit Benzylchlorid	68
2.2.2.2.3.	Abspaltung des Benzylesters	72
2.2.2.2.4.	Einführung von Diäthylenmonoglycol-methyläther als Carboxylschutzgruppe	75
2.2.3.	Darstellung und Isolierung geeigneter Fragmente	77
2.2.3.1.	Spaltung mit Trypsin	77
2.2.3.2.	Isolierung der Spaltstücke	79
2.2.3.3.	Spaltung mit Trypsin in Gegenwart von Hydrazin	84
2.2.3.4.	Isolierung der Spaltstücke	88
2.2.4.	Veresterung der Fragmente	91

2.2.4.1.	Veresterung von TFA-T_2 mit Phenyldiazomethan	91
2.2.4.2.	Veresterung von TFA-T_1 und TFA-T_2 mit Benzylchlorid	92
2.2.5.	Kupplung von TFA-T_1 mit TFA-T_2	94
2.2.6.	Abspaltung der Schutzgruppen und Isolierung des gekuppelten Produkts	99
2.2.6.1.	Abspaltung der Benzylgruppen und Isolierung des gekuppelten Produkts	99
2.2.6.2.	Abspaltung der TFA-Gruppe	105
2.2.7.	Einlagerung von Hämin	106
2.2.7.1.	CD-Messungen	106
2.2.7.2.	Titrationskurven	113
2.2.7.3.	UV-Spektren	116
2.2.8.	Ergebnisse	125
3.	Experimenteller Teil	128
3.1.	Ferredoxin	128
3.1.1.	Gewinnung von Ferredoxin aus Clostridium pasteurianum und Clostridium acidi urici	128
3.1.2.	Darstellung von Apoferredoxin	130
3.1.2.1.	Darstellung von Apoferredoxin mit Trichloressigsäure	130
3.1.2.2.	Darstellung von Apoferredoxin mit Dipyridyl	131

3.1.2.3.	Darstellung von Apoferredoxin mit Mersalylnatrium	131
3.1.3.	Resynthese von Ferredoxin aus Apoferredoxin	132
3.1.4.	Trypsinspaltung	133
3.1.4.1.	Test auf Trypsinspaltung mit Carboxypeptidase B	133
3.1.4.2.	Edman Abbau	133
3.1.5.	Sulfonierungsexperimente	134
3.1.5.1.	Darstellung und Messung der radioaktiven Lösung	134
3.1.5.2.	Sulfonierung mit $CuSO_4$	135
3.1.5.3.	Sulfonierung mit $CuSO_4$ und Cystein	135
3.1.6.	Proteinbestimmung	136
3.1.6.1.	Proteinbestimmung durch UV-Messung	136
3.1.6.2.	Proteinbestimmung durch Folintest	136
3.1.7.	Aminosäureanalyse	137
3.2.	Myoglobin	137
3.2.1.	Darstellung der Ausgangssubstanzen	137
3.2.1.1.	Darstellung von Apomyoglobin	137
3.2.1.2.	Darstellung von TFA-Apomyoglobin	138
3.2.1.3.	Darstellung von Citraconyl-Apomyoglobin	138

3.2.1.4.	Darstellung von Azibenzil	139
3.2.1.5.	Darstellung von Phenyldiazomethan	140
3.2.1.6.	Darstellung des Palladium Katalysators	141
3.2.2.	Darstellung und Isolierung von Fragmenten	141
3.2.2.1.	Einfache Trypsinspaltung	141
3.2.2.2.	Spaltung mit Trypsin in Gegenwart von 2 m Hydrazin	142
3.2.2.3.	Isolierung der Spaltstücke	142
3.2.3.	Carboxylschutzgruppen	143
3.2.3.1.	Veresterung von TFA-Apomyoglobin mit Dicyclohexylcarbodiimid und Diäthylenclycolmonomethyläther	143
3.2.3.2.	Veresterung von TFA-Apomyoglobin mit chloriertem Diäthylenglycolmonomethyläther	143
3.2.3.2.1.	Darstellung von chloriertem Diäthylenglycolmonomethyläther	143
3.2.3.2.2.	Veresterung der Carboxylgruppen	143
3.2.3.3.	Veresterung der Carboxylgruppen mit Phenyldiazomethan	144
3.2.3.4.	Veresterung der Carboxylgruppen mit Benzylchlorid und Tetraäthylammoniumhydroxyd	144
3.2.3.4.1.	Veresterung von Boc-Glycin	144
3.2.3.4.2.	Veresterung von TFA-Apomyoglobin	145
3.2.4.	Kupplung von TFA-T_1 und TFA-T_2	145

3.2.4.1. Verseifung von TFA-T_1-Arginin 145

3.2.4.2. Kupplungsreaktion 146

3.2.5. Abspaltung der Schutzgruppen 146

3.2.5.1. Abspaltung der TFA-Gruppe 146

3.2.5.2. Abspaltung der Benzylestergruppen 147

3.2.5.2.1. Abspaltung durch Hydrierung 147

3.2.5.2.2. Abspaltung mit Fluorwasserstoff 147

3.2.6. Tests 148

3.2.6.1. Proteinbestimmung 148

3.2.6.1.1. UV-Messung 148

3.2.6.1.2. Aminosäureanalyse 148

3.2.6.2. Enzymatische Tests 149

3.2.6.2.1. Test auf Trifluoracetylierung 149

3.2.6.2.2. Test auf Spaltung mit Trypsin 149

3.2.6.2.3. Test auf Veresterung 149

3.2.6.2.3.1. Mit Papain und Aminopeptidase M 149

3.2.6.2.3.2. Mit Pepsin und Aminopeptidase M 150

3.2.6.2.3.3. Mit Trypsin und Carboxypeptidase bei den Fragmenten TFA-T_1 und TFA-T_2 151

3.2.6.2.4. Test auf Kupplung 151

3.2.6.3. Test auf Einlagerung von Hämin 152

3.2.6.3.1. Titrationskurve 152

3.2.6.3.2. UV-Spektren 152

3.2.6.3.3. Circulardichroismus 153

3.2.6.3.3.1. CD-Kurve von Apomyoglobin 154

3.2.6.3.3.2. CD-Kurve von Apomyoglobin rekombiniert mit Hämin 154

3.2.6.3.3.3. CD-Kurve von TFA-Apomyoglobin nach Abspaltung der Schutzgruppe 155

3.2.6.3.3.4. CD-Kurve von TFA-Apomyoglobin rekombiniert mit Hämin nach Abspaltung der Schutzgruppe 156

3.2.6.3.3.5. CD-Kurve von TFA-Benzyl.-Apomyoglobin nach Abspaltung der Schutzgruppen 157

3.2.6.3.3.6. CD-Kurve von TFA-Benzyl.-Apomyoglobin rekombiniert mit Hämin nach Abspaltung der Schutzgruppen 157

3.2.6.3.3.7. CD-Spektrum von T_1——T_2 gekuppelt 158

3.2.6.3.3.8. CD-Spektrum von T_1——T_2 gekuppelt nach Einlagerung von Hämin 159

3.2.7. Produktcharakterisierung 160

3.2.7.1. Isoelektrische Fokussierung 160

3.2.7.2. Diskelektrophorese 163

4. Zusammenfassung 166

5. Literaturverzeichnis 171

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Boc-	tert. - Butyloxycarbonyl - Gruppe
CD	Circulardichroismus
Clost. acidi u.	Clostridium acidi urici
Clost. past.	Clostridium pasteurianum
DCCI	NN `Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Diäthylaminoäthyl
Diglyme	Diäthylenglykolmonomethyläther
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuclease
NR_4	quartäres Ammoniumsalz
PTH	3-Phenyl-2-thiohydantoin
RNase	Ribonuclease
T_1, T_2, T_3	Trypsinspaltstücke
TFA	Trifluoracetyl-Gruppe
TCPK	N-(1-Benzyl-3-chlor-2-oxo-propyl)-p-toluolsulfonamid
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propandiol

1. Einleitung

Die zentrale Reaktion bei der chemischen Totalsynthese von Polypeptiden ist die Knüpfung der Peptidbindung, d.h., die Kondensation der Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure. Da drastische Bedingungen, wie hohe Temperatur, die nötig wäre, um eine freie Carboxylgruppe mit einer Aminogruppe zu verbinden, wo möglich vermieden werden, geht man zweckmäßigerweise bei dieser Reaktion von aktivierten Carboxylkomponenten aus und erhält durch wiederholte, gezielte Kupplung von Aminosäuren längere Peptide. Nach der klassischen Methode der Totalsynthese von Polypeptiden gibt es dafür zwei Möglichkeiten:

1. Sämtliche reaktiven Seitengruppen, vor allem die der trifunktionellen Aminosäuren, die nicht an der Kupplungsreaktion beteiligt sind, werden maximal blockiert. Durch stufenweise Kondensation von solchen vollgeschützten Aminosäuren gelingt der Aufbau von Peptidfragmenten, die dann zu größeren Einheiten verknüpft werden. Auf diese Weise gelang z.B. die Totalsynthese des Glucagons mit 39 Aminosäuren, des Calcitonins mit 32 Aminosäuren und des Insulins mit 51 Aminosäuren (1,2,3,4). Allerdings ist bei einer Peptidsequenz von 30 - 50 Aminosäureresten diese Möglichkeit der Peptidsynthese erschöpft, da mit zunehmender Länge vollgeschützter Peptidketten die Löslichkeitsprobleme ebenso steigen wie der Arbeitsaufwand. (5)

2. Die mehrfunktionellen Aminosäuren werden minimal maskiert, d.h., lediglich die ω-Aminogruppen und die Mercaptofunktionen müssen blockiert werden. Die Aminosäuren werden dann systematisch mittels N-Carbonsäureanhydrid zu Peptidfragmenten verknüpft. Für den weiteren Aufbau müssen die als N-Acyl-Peptidester erhaltenen Fragmente, mit Ausnahme des C-terminalen Bruchstücks, in die N-Acyl-Peptidhydrazide überführt werden, die dann ausschließlich nach der Azidkupplungsmethode an das carboxylendständige Bruchstück angeknüpft werden können. Zwar sind die günstigeren Löslichkeitseigenschaften der nach diesem Prinzip hergestellten Fragmente, wie auch die durch die hohe Reaktivität der N-Carbonsäureanhydride bedingte schnelle Verknüpfung, eindeutige Vorteile dieses Verfahrens; jedoch ist die Sicherheit eines nebenproduktfreien Aufbaus der Teilsequenzen nicht gegeben. Die immer wieder notwendige Zwischenreinigung und Trennung des Synthesegemisches, wie auch die Einschränkung der Verknüpfungstechnik auf die Azidmethode, erschweren diese Synthesestrategie. (6,7)

Eine andere Synthesestrategie wurde von Merrifield entwikkelt. Der Grundgedanke dieser Methode besteht darin, eine Aminosäure mit der Carboxylgruppe an ein Polymer zu knüpfen und vom C-terminalen Ende her die Polypeptidkette stufenweise aufzubauen. Zu diesem Zweck wird eine N-geschützte Aminosäure mit einer reaktiven Gruppierung des Trägers zur

Reaktion gebracht. Von der, an einem solchen Trägerpartikel kovalent verankerten Aminosäure wird dann die Schutzgruppe entfernt und das resultierende Aminoacylpolymer mit einer weiteren N-blockierten Aminosäu re umgesetzt. Alle nicht am Polymer fixierten Moleküle, wie überschüssige Aminosäure, Kupplungskomponente und Nebenprodukte können leicht entfernt werden. Die letzte Stufe der Synthese besteht in der Spaltung der kovalenten Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure der Polypeptidkette und dem polymeren Träger, sowie der Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen. Da sich Kupplung, Deblockierung und Filtration immer wiederholen, kann das Gesamtpeptid stufenweise, ohne Zwischenreinigung durch automatisierte oder mechanisierte Aufbautechnik erstellt werden, was zweifelsohne gegenüber beiden anderen Synthesestrategien einen enormen Zeitgewinn bedeutet. (8,9)

Die Problematik bei dieser Methode beruht auf der möglichen unvollständigen Umsetzung, die zu Rumpf- und Fehlsequenzen führt. Diese können weder abgetrennt noch analytisch von der gewünschten Sequenz unterschieden werden. Da theoretisch gesehen die Zahl der Fehlpeptide exponentiell mit zunehmender Kettenlänge wächst, könnte nur eine 100%ige Ausbeute bei jedem Kupplungsschritt die Bildung von Fehlsequenzen verhindern. (10)

Trotz immer wieder verbesserter Verfahrenstechniken zur Totalsynthese von Peptiden bleibt die Darstellung längerer

Peptide wegen des enormen Zeitaufwands und der technischen Schwierigkeiten weiterhin ein Problem. Die Darstellung von Ribonuclease (11) spricht nur scheinbar dagegen; denn ein Nachweis der Aktivität ist kein Beweis der richtigen Sequenz. Selbst modifizierte Proteine können nahezu die gleiche Aktivität besitzen wie das natürliche Protein. (12,13)

Gerade aber um den Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität zu erforschen, wird die Darstellung von Enzymanaloga gefordert. Sind es längere Proteine, die sich nur in einzelnen Aminosäuren oder Teilsequenzen vom natürlichen unterscheiden, so stellt die Technik der Semisynthese eine echte Alternative zur Totalsynthese dar. Sie bietet die Möglichkeit, natürliche Proteinfragmente als fertige Zwischenprodukte zur Synthese einzusetzen. (14) Auch die Umbildung von nutzbarem tierischen Protein in die seltene, aber klinisch benötigte Variante, könnte mittels Semisynthese erreicht werden.

Eine Reihe von erfolgreichen Arbeiten über die Darstellung von Analoga durch kontrollierte und gut charakterisierte Umgestaltung von natürlich vorkommendem Material ist durchgeführt worden, jedoch bestanden diese Arbeiten vorwiegend aus Disulfid-Austausch, Modifizierung oder Blockierung eines einzelnen Aminosäurerestes.

So konnte Dixon bei Corticotropin A_1 durch Behandlung mit

Perjodat den N-terminalen Serinrest zunächst in eine Glyoxylgruppe und anschließend mit Cu-Glutamat in einen Glycinrest umwandeln. Dieses Corticotropinderivat hatte sowohl das gleiche Retentionsvolumen bei der Chromatographie als auch die gleiche Aktivität wie das natürliche Protein. (12)

Ein weiteres synthetisches Enzym wurde von Polgar durch die Transformation des reaktiven Serinrestes im Zentrum von Subtilisin erhalten. Die Umwandldung in einen Cysteinrest gelang fast quantitativ mit Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF). (13)

In den meisten Fällen binden bei hydrolytischen Enzymen die OH-Gruppen des Serins oder die Thiol-Gruppen von Cysteinresten das Substrat kovalent. Da diese zwei Aminosäuren sich nur durch das Sauerstoff- und Schwefelatom der Seitenkette unterscheiden, ist es enzymologisch äußerst interessant, diese zwei Typen von hydrolytischen Enzymen ineinander überzuführen. Trotz der vermuteten Änderung in der sterischen Struktur des aktiven Zentrums bei der Überführung in das Thiol-Enzym, behält das synthetische Produkt den Großteil der Aktivität bei.

Durch verschiedene Kombination von natürlichen und synthetisierten Ketten des Rinder-, Schaf-, Schwein- und Menschen-Insulins versuchte Panayotis, die Verwandtschaftsbe-

ziehungen und die notwendige Information für Faltung und Orientierung der Ketten zueinander zu studieren. (15) Die Kombinationsausbeuten variierten zwar von 12 - 42 %, hatten jedoch keinen Einfluß auf die spezifische Aktivität, die bei jeder Kombination identisch war mit dem natürlichen Protein.

Einen weiteren Fortschritt in der Semisynthesetechnik brachte die Umwandlung von Menschen-ß-Melanotropin (MSH) in Schweinemelanotropin. (16) Der Unterschied dieser Analoga besteht darin, daß Schweinemelanotropin ein zusätzliches Tetrapeptid am N-terminalen Ende aufweist und auf Position 6 einen Argininrest statt eines Lysinrestes besitzt.

$$\text{Ala-Glu-Lys-Lys-}\left[\text{Arg}^{6}\right]\text{-}\beta^{p}\text{-MSH}$$

Lande synthetisierte das mit t-Butylderivaten geschützte Tetrapeptid und acylierte es mit β^{p}-MSH nach der Azidkupplungsmethode. Der Vorteil dabei war, daß β^{p}-MSH außer der freien Endaminogruppe nur zwei ε-Aminogruppen in Position 6 und 17 hat, die infolge der pk-Differenz nicht geschützt werden mußten. Bei seinen weiteren Versuchen, mit Hilfe der Semisynthese Hybridmelanotropin herzustellen, zeichneten sich die Hauptprobleme der Synthesetechnik aus Fragmenten bereits ab.

Probleme der Semisynthesetechnik

1. Die Darstellung geeigneter Oligopeptide aus dem Gesamtprotein ist eine der Hauptschwierigkeiten der Semisynthesetechnik. Offord schlägt vor, natürliche Proteinfragmente mit Hilfe selektiv spaltender Enzyme wie Trypsin oder Reagenzien wie CNBr zu gewinnen. (14, 17,18) Bei der Behandlung des Proteins mit CNBr erfolgt ein Angriff auf die Methioninreste. Gegenüber Trypsin, das die Lysin- und Arginin-Bindungen spaltet, hat CNBr den Vorteil, daß Methioninreste in Peptiden relativ selten sind und dadurch weniger Spaltstücke erwartet werden müssen. Da dabei aber Methionin in Homoserin übergeführt wird, kann CNBr nur verwendet werden, wenn Homoserin verlangt wird oder toleriert werden kann.

2. Die zweite Schwierigkeit bereitet die Einführung reversibler Schutzgruppen. Um später eine gezielte Kupplung der Fragmente durchführen zu können, müssen sämtliche reaktiven Seitengruppen der Oligopeptide blockiert werden. Wichtig dabei ist, daß diese Schutzgruppen ohne Schädigung des Syntheseprodukts wieder abgespalten werden können.

Da es sich bei den bisherigen Studien der Semisynthese vorwiegend um die Umgestaltung eines Restes, Disulfidaustausch und Acylierung handelte, wurden diese Hauptschwierigkeiten bei Verwendung größerer natürlicher Fragmente noch wenig diskutiert und untersucht. (19) Die zum Teil drastischen Bedingungen zum Schutz funktioneller Seitengruppen wurden jedoch an freien Aminosäuren entwickelt, und es ist durchaus nicht sicher, ob sie auf Peptide übertragen werden können. Auch ist nicht untersucht worden, in wie weit unter solchen Bedingungen eine Spaltung von Peptidbindungen oder andere Nebenreaktionen auftreten.

In dieser Arbeit soll an zwei Proteinen, dem Ferredoxin und Myoglobin, untersucht werden, unter welchen Bedingungen und ob überhaupt eine Synthese längerer Peptide und Proteine aus natürlichen Fragmenten möglich ist, die anhand ihrer charakteristischen Resynthesefähigkeit und biologischen Aktivität verfolgt werden kann.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Untersuchungen zur Semisynthese von Ferredoxin

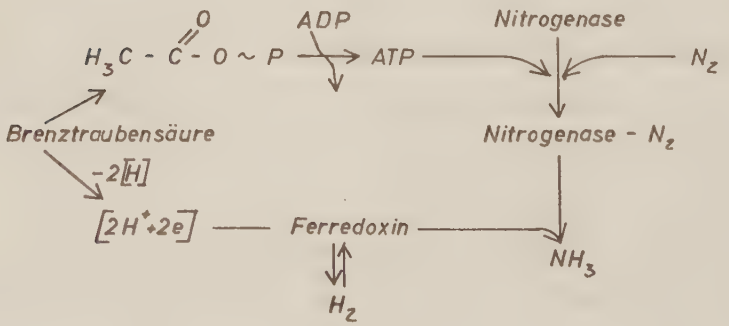
2.1.1. Einführung, spezielle Problematik und Synthesestrategie

Für die hier durchgeführten Versuche wurde Ferredoxin aus den anaeroben Bakterien Clostridium pasteurianum und Clostridium acidi urici verwendet. Es sind braungefärbte, eisenhaltige Elektronentransportproteine mit 55 Aminosäuren (Abb.: 1,2), deren Sequenz aufgeklärt ist. (20,21) Sie enthalten weder Häm noch Flavin und nehmen eine zentrale Stelle bei der Stickstoff-Fixierung ein. (22,23,24)

Unter den Organismen, welche freien Stickstoff verwerten, sind die freilebenden von den Symbionten zu unterscheiden. Zur ersten Gruppe gehören aerobe und anaerobe Bakterien sowie Vertreter der phototrophen Bakterien (Rhodospirillum, Chromatium), einige Blaualgengattungen (Nostoc, Tolypothrix) und Hefen (Rhodotorula). In der zweiten Gruppe sind neben einigen Blaualgenarten die Vertreter der "Knöllchenbakterien" (Rhizobium) vereinigt, welche symbiontisch in den Wurzelzellen höherer Pflanzen, vor allem von Leguminosen, leben. (25)

Die Aufklärung des Stickstoff-fixierenden und reduzierenden Systems gelang Mortenson und Mitarbeiter. Sie konnten den

Zellextrakt aus Clos. past. in eine N_2-aktivierende Fraktion und in ein Wasserstoffdonator-System trennen. Weder das eine noch das andere ist für sich allein zur Stickstoffreduktion in der Lage. (21,22,23) Die Arbeitshypothese geht davon aus, daß ein N_2-Molekül eine Bindung mit dem wirksamen Enzym, der Nitrogenase, eingeht, wodurch seine schrittweise Reduktion ohne Öffnung der Bindung zwischen den beiden N-Atomen möglich wird. Im letzten Schritt werden Enzym und NH_3 freigesetzt. Der Wasserstoff soll dabei durch Ferredoxin, einem Nicht-Häm-Eisenproteid aktiviert werden. Als Energieäquivalent fungiert ATP, welches aus Acetylphosphat unter Mitwirkung der Acetokinase entsteht. Vorstufe desselben ist die Brenztraubensäure, welche außerdem reaktionsfähigen Wasserstoff bereitstellt. (26,27,28,29)



Alle Ferredoxine, die inzwischen aus verschiedenen Organismen isoliert werden konnten, zeichnen sich durch ein für biologische Verhältnisse extrem niedriges Redoxpotential von -0,42 Volt aus, das praktisch mit dem der Wasserstoff-Elektrode (H_2/H^+) identisch ist. Ferredoxine können daher eine Funktion als Elektronenüberträger auch bei solchen Reaktionen ausüben, die mit der Freisetzung oder Nutzbarmachung von molekularen Wasserstoffs verbunden sind.

Das Aktivzentrum des Clostridienferredoxins bilden die 8 Cysteinreste der Proteinkette, die 8 Eisenatome und die 8 "labilen" Schwefelatome. Labil deshalb, weil bei Säurebehandlung oder Denaturierung H_2S in einer, dem vorhandenen Eisen äquivalenten Menge, freigesetzt wird. Der räumliche Bau dieses 3-dimensionalen Fe-S-Clusters, die Gesamtkoordination der Metallatome und die effektive Ladungsverteilung sind inzwischen durch Röntgenstrukturanalyse geklärt worden.

Ferredoxin ist aus mehreren Gründen für Syntheseversuche aus Fragmenten interessant:

1. Da die Totalsynthese von Ferredoxin (Clostridium pasteurianum) nach Merrifield ein Apoprotein ergab, das nicht zur Resynthese fähig war, obgleich natürliches Apoferredoxin nach Zugabe von Mercaptoäthanol, Na_2S und $FeSO_4$

$(NH_4)_2 \cdot 6H_2O$ zu 70 - 80 % Ferredoxin rückbildet. Auch aus dem nach Merrifield getrennt synthetisierten Teilsequenzen 1-29, 30-55 konnte kein ferredoxinähnliches Produkt erhalten werden. (30)

2. Die beiden verwendeten Ferredoxine erfüllen die wichtigste Voraussetzung für die Semisynthese, nämlich die Darstellungsmöglichkeit geeigneter Fragmentoligopeptide aus dem Gesamtprotein. So können durch Trypsinspaltung von Ferredoxin acidi urici 2 gleichgroße Fragmente erhalten werden. Ferredoxin acidi urici besitzt nur 1 Arginin an Position 29 und keine Lysinreste.

   Bei Ferredoxin pasteurianum können durch Spaltung mit Chymotrypsin 3 Fragmente erhalten werden; denn an Position 2 befindet sich ein Tyrosinrest und an Position 30 ein Phenylalaninrest.

3. Die Resynthesefähigkeit des semisynthetischen Apoferredoxins kann gut verfolgt werden, einerseits anhand der Aktivität bei Oxidations- und Reduktionsreaktionen, andererseits am Extinktionsverhältnis E 390/285.

Synthesestrategie

1. Isolierung von Ferredoxin

Die Zellwände der Clostridien Bakterienzellen werden durch Ultraschall zerstört und Ferredoxin an DEAE-Cellulose adsorbiert. Die Reindarstellung soll durch mehrmalige Chromatographie an Sephadex- und DEAE-Säulen erreicht werden.

2. Darstellung von Apoferredoxin

Von Ferredoxin werden Dipyridyl-, Trifluoracetyl- und Mersalylapoproteine dargestellt.

3. Reversible Blockierung der Cystein SH-Gruppen

Die 8 Cysteinreste werden durch S-Sulfonierung blockiert. Der quantitative Verlauf der Reaktion wird mittels radioaktiver Markierung (^{35}S) verfolgt.

4. Spaltung des S-sulfonierten Produkts

S-sulfoniertes acidi urici Apoferredoxin wird mit Trypsin gespalten. Man erhält 2 Fragmente: 1-29, 30-55.

5. Resynthese

Die Resynthesefähigkeit der Fragmente wird anhand der charakterisitischen Extinktionsverhältnisse E 390/E 285 bestimmt.

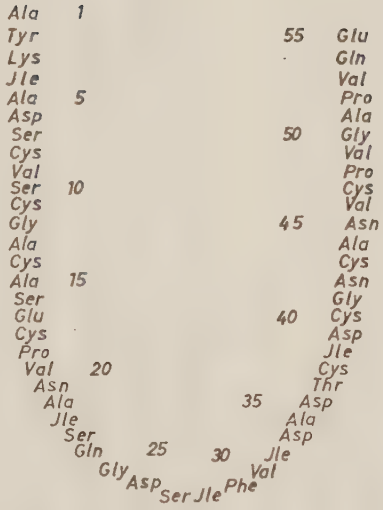


Abb.: 1

Aminosäuresequenz von Clost. past. Ferredoxin

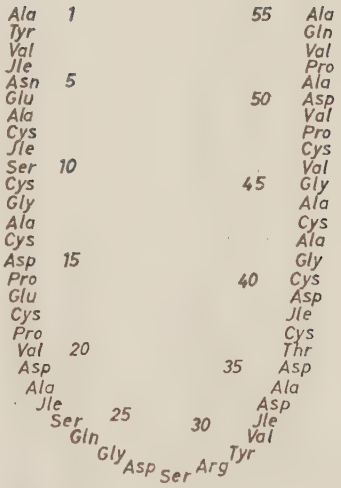


Abb.: 2

Aminosäuresequenz von Clost. acidi urici Ferredoxin

2.1.2. Isolierung von Ferredoxin

Seit Mortenson und Mitarbeiter, die zum erstenmal Ferredoxin aus Clostridium pasteurianum isoliert hatten, sind immer bessere und schnellere Reinigungsmethoden entwickelt worden. (31,32,33,34,35) Alle jedoch nützen die gemeinsame Eigenschaft der bisher isolierten Ferredoxine unterschiedlichster Aminosäuresequenz aus, nämlich ihre außergewöhnliche Affinität zu Diäthylaminoäthyl (DEAE)-Cellulose, die weder reduziertes Ferredoxin noch Apoferredoxin besitzt.

Das hier benützte Isolierungsverfahren ist eine Variante (Abb.: 4) der von Hagenmaier und Schneider ausgearbeiteten Reinigungsschritte.

Die Isolierung beginnt ebenfalls mit der Ultraschallbehandlung von Clostridienzellen. Normalerweise können diese Bakterienzellen in destilliertem Wasser durch Autolyse oder nach kurzer Ultraschallbehandlung zerstört werden, was bei den hier verwendeten Zellen unmöglich zu erreichen war. Die auf Grund der Züchtungsbedingungen widerstandsfähig gewordene Zellwand war erst durch viermaliges Behandeln der Zellen mit Glaskugeln und Ultraschall zu zerstören.

Nach der Zentrifugation der Zellrückstände konnte das gesamte, im Zellextrakt vorhandene Ferredoxin an DEAE-Cellulose adsorbiert, mit 1 m NaCl-Lösung eluiert und durch

portionsweise Chromatographie an einer G-25 und G-50 Sephadexsäule (100 x 3 cm) vorgereinigt werden. Die Ausbeuten und das Extinktionsverhältnis nach diesen Reinigungsschritten sind in Abb.: 3 zusammengefaßt.

	Clost. past.	Clost. acidi u.
Ausbeute an Ferredoxin	147 mg	338 mg
Extinktionsverhältnis E 390/E 285	0,67	0,69

Abb.: 3

Ausbeute und Extinktionsverhältnis von Ferredoxin nach der 1. Chromatographie an G-25 und G-50 Sephadexsäulen.

Um ein Extinktionsverhältnis E 390/E 285 von 0,78 zu erhalten, was reinem Ferredoxin entspricht, wurde Ferredoxin üblicherweise durch mehrmalige Gradientenelution an DEAE-Cellulose weitergereinigt. Nach dieser Methode konnte nur 46 % Reinferredoxin, bezogen auf die Menge Ferredoxin nach der 1. Chromatographie an G-25 und G-50 Sephadexsäulen, erhalten werden.

Behandelt man hingegen Ferredoxin mit RNase und DNase, um die Nucleinsäuren zu spalten, die ein ähnliches Molekulargewicht wie Ferredoxin besitzen können und somit einen Hauptbestandteil der Verunreinigungen darstellen, so erhält

man nach anschließender Chromatographie an G-25,G-50 und G-75 Sephadexsäulen (100 x 3 cm) (Abb.: 5,6) 58 % ebenso reines Ferredoxin (wiederum bezogen auf die Menge Ferredoxin nach der 1. Chromatographie an G-25 und G-50 Sephadexsäulen). (36,37)

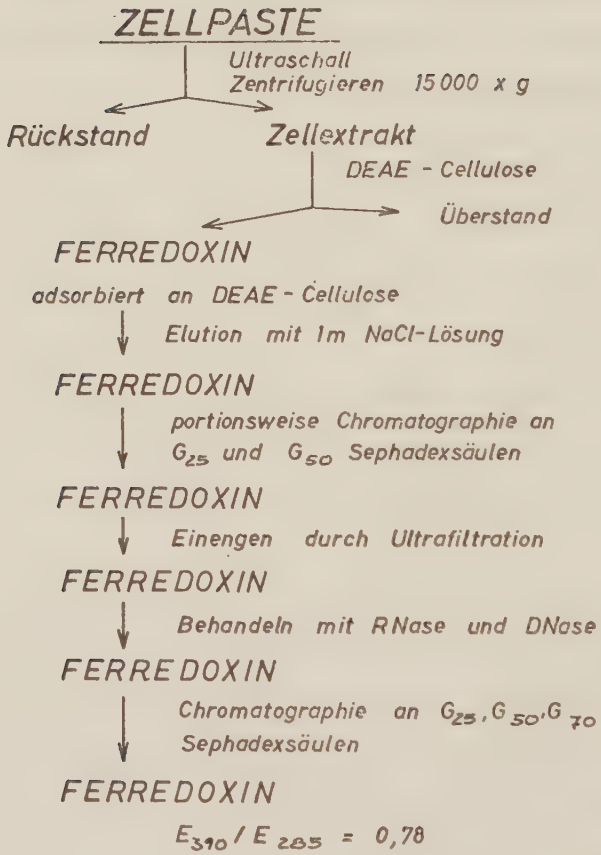


Abb.: 4

Isolierung von Clostridienferredoxin

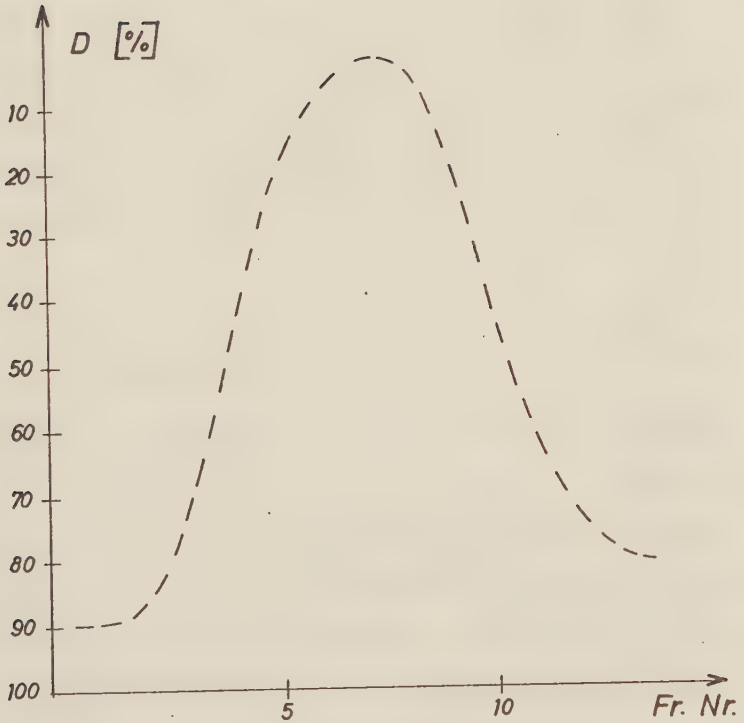


Abb.: 5

Chromatographie von Clost acidi urici Ferredoxin an Sephadex G_{75} (Säule 100 x 3 cm)

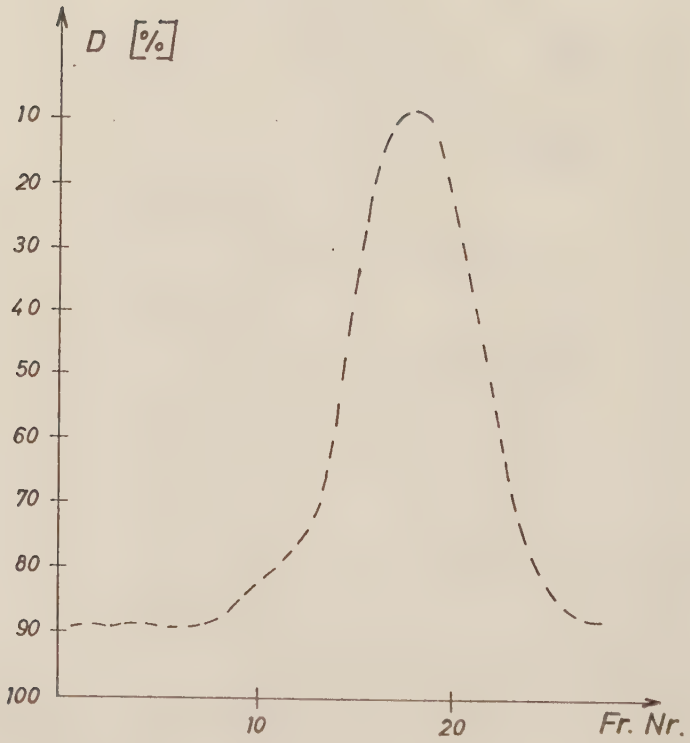


Abb.: 6

Chromatographie von Clost. past. Ferredoxin an Sephadex G_{75} (Säule : 100 x 3 cm)

2.1.3. Untersuchungen über die Darstellungsmöglichkeiten von Apoferredoxin

Die in der Literatur beschriebenen verschiedenen Methoden zur Darstellung von Apoferredoxin, das heißt, Abspaltung von Eisen aus Ferredoxin, wurden auf ihre Brauchbarkeit in Bezug auf die Proteinausbeute, Reinheit und Resynthesefähigkeit beim hier isolierten Ferredoxin aus Clostridium pasteurianum untersucht. (37 - 46)

2.1.3.1. Darstellung von Apoferredoxin mit Hilfe von Eisenkomplexbildnern

Zuerst wurde versucht, das Eisen mit Hilfe von $\alpha\alpha'$-Dipyridyl in Gegenwart von Dithionit zu entfernen und den Fe-II-Dipyridylkomplex an einer Chelex-100 Säule vom farblosen Apoprotein, das nun keine Elektronenüberträgereigenschaften mehr besitzt, zu trennen. Beim hier verwendeten Ferredoxin war es jedoch selbst nach mehrmaliger Behandlung mit der Reduktionslösung nicht möglich, das gesamte Eisen als Komplex zu binden. Ein farbloses, zur Resynthese fähiges Apoprotein konnte erst nach anschließender Chromatographie an DEAE-Cellulose zu 56,56 % gewonnen werden.

Eingesetztes Ferredoxin	25 mg
Gewonnenes Apoferredoxin	12,5 mg
Resynthese	55 %
E 390/E 285	0,76

2.1.3.2. Darstellung von Apoferredoxin mit Mersalylnatrium

Die hier als nächstes untersuchte Darstellungsmethode von Apoferredoxin ist zugleich die älteste. Durch Behandeln von Ferredoxin mit Mersalyl-Natrium konnte ein mersalylhaltiges, resynthetisierfähiges Apoprotein erhalten werden, jedoch ist der Proteinverlust durch die anschließend erforderliche mehrmalige Chromatographie an G-25 Sephadexsäulen beträchtlich. (47)

Eingesetztes Ferredoxin	157 mg
Gewonnenes Apoferredoxin nach dreimaliger Chromatographie	60 mg = 43,29 %
Resynthese	69 %
E 390/E 285	0,76

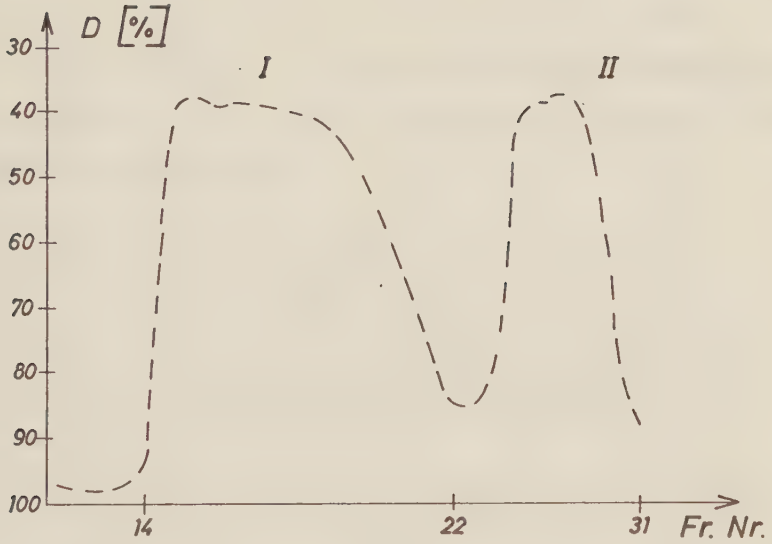


Abb.: 7

1. Chromatographie von Mersalyl - Apoferredoxin an Sephadex G_{25} (100 x 3 cm)
peak I : Mersalyl - Apoferredoxin
peak II : Mersalyl - Natrium

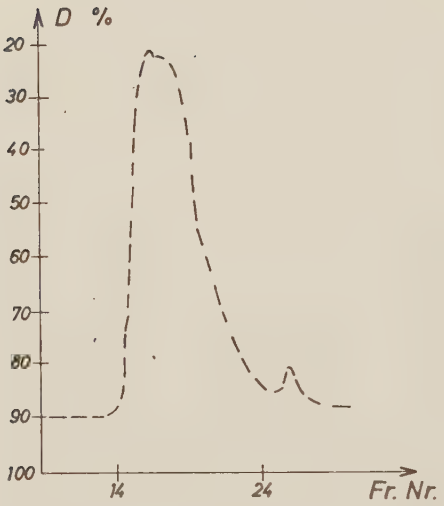


Abb.: 8

2. Chromatographie von Mersalyl - Apoferredoxin an Sephadex G_{25} (100x3cm)

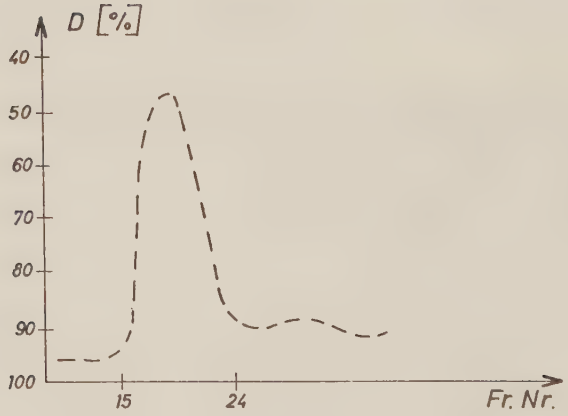


Abb.: 9

3. Chromatographie von Mersalyl – Apoferre - doxin an Sephadex G_{25} (100 x 3cm)

2.1.3.3. Darstellung von Apoferredoxin mit Trichloressigsäure

Die Darstellung von Apoferredoxin mit Trichloressigsäure beruht darauf, daß Ferredoxin in 5 %iger Trichloressigsäurelösung nicht mehr stabil ist und eisenfreies Apoprotein ausfällt.

Da auch das nach dieser Methode dargestellte Apoferredoxin braun gefärbt war, mußten weitere mögliche Reinigungsschritte untersucht werden.

1. Abtrennen der braunen Farbe durch Ultrafiltration

Die Ultrafiltration bietet die Möglichkeit, Stoffe mit niedrigem Molekulargewicht abzutrennen. So passiert z.B. Eisen die Ultrafiltrationsmembran, während Ferredoxin zurückbleibt.

Das gefällte Apoprotein wird also in 1 m Tris aufgelöst und ultrafiltriert. Überraschend dabei war, daß zwar Ferredoxin zurückgehalten wird, jedoch die Membran, wie der Folin-Test zeigte (Abb.: 10), für Apoferredoxin, bedingt durch die veränderte Konformation, zu 62,81 % durchlässig wird. (48) Eine Reinigung nach dieser Methode scheidet damit aus.

	E 750
Blindprobe	0,064
Folintest im Innenraum der Ultrafiltrationszelle	0,32
Folintest in der austropfenden Lösung	0,201

Abb.: 10

Folintest

2. Behandeln des ausgefällten Apoproteins

Das mit Trichloressigsäure gefällte, gefärbte Apoprotein wird zentrifugiert, mit 0,023 m Ameisensäure (0,05 m an Mercaptoäthanol) gewaschen, in 0,1 m Tris-HCl-Puffer pH 9 aufgelöst und zweimal an G-25 Sephadexsäulen gereinigt. Dieses so gewonnene Apoferredoxin war weiß und resynthetisierfähig.

Obgleich auch hier ein Verlust an Protein zu verzeichnen war, erwies sich diese Methode als beste und schnellste Darstellungsmöglichkeit des Apoferredoxins sowohl von Clostridium pasteurianum als auch von Clostridium acidi urici.

Clostridium pasteurianum

Eingesetztes Ferredoxin	62 mg
Gewonnenes Apoferredoxin	37 mg = 67,6 %
Resynthese	70 %
E 390/E 285	0,77

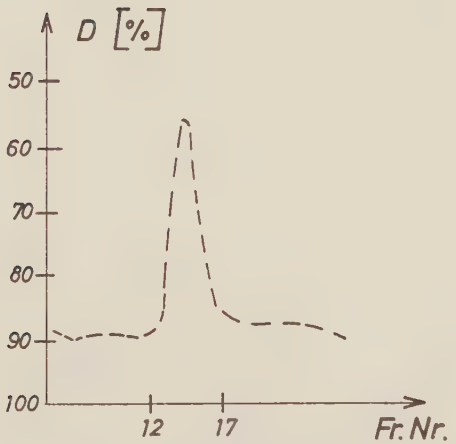


Abb.: 11
Chromatographie
von Clost. past. Apoferredoxin
an G_{25}-Sephadex (100 x 3 cm)

Clostridium acidi urici

Eingesetztes Ferredoxin	44 mg
Gewonnenes Apoferredoxin	28,16 mg = 72,48 %
Resynthese	65 %
E 390/E 285	0,77

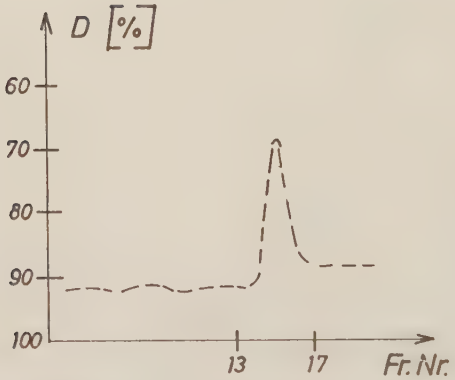


Abb.: 12
Chromatographie
von Clost. acidi urici
Apoferredoxin an G_{25}-
Sephadex (100 x 3 cm)

2.1.4. Reversible Blockierung der Cystein SH-Gruppen

Wie bei allen Versuchen, Proteine mit Hilfe der Totalsynthese oder Semisynthese aufzubauen, stellt die Einführung reversibler Schutzgruppen für alle reaktiven Seitenketten des Proteins eines der Hauptprobleme dieses Unternehmens dar.

Für Ferredoxin, das hier aus 2 oder 3 Fragmenten synthetisiert werden soll, müssen zunächst reversible SH-Schutzgruppen gefunden werden. Diese sind notwendig wegen der starken Nucleophilie, leichten Oxidierbarkeit und des sauren Charakters der SH-Gruppen. Für sie gelten die gleichen Kriterien aller Schutzgruppen, nämlich:

1. Sie müssen selektiv einführbar sein, ohne andere Nebenreaktionen zu verursachen.

2. Die Blockierung muß quantitativ unter peptidschonenden Bedingungen verlaufen.

3. Eine leichte und vollständige Deblockierung muß gewährleistet sein.

Aus der Vielzahl der angebotenen SH-Schutzgruppen gibt es jedoch wenige, die selektiv und reversibel die Cysteinreste in Proteinen zu blockieren vermögen.

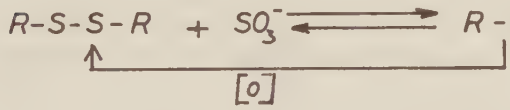
So ist Jod (49,50) zwar in der Lage, die SH-Gruppen reversibel zu modifizieren, reagiert jedoch mit weiteren Aminosäureresten wie Tyrosin, Histidin, Tryptophan und Methionin fast ebenso gut.

Läßt man die Cysteinreste in Proteinen wie Papain und Insulin mit Methyl-p-nitrobenzolsulfonat (51) reagieren, so erhält man quantitativ und selektiv die S-Methylderivate ohne schädliche Nebenreaktionen; jedoch liegen hierbei die Schwierigkeiten bei der, oft später erforderlichen, Abspaltung. Die so modifizierten Gruppen sind selbst gegen Säurehydrolyse stabil. In Anbetracht der Strukturanalyse von Proteinen besitzt diese Tatsache zweifelsohne ihren Vorteil, da die S-Methylcysteine durch Perameisensäure oxidiert und als Cysteinsäure im Hydrolysat noch nachgewiesen werden können, während freies Cystein unter diesen Bedingungen nicht mehr stabil ist. Auch zur Interpretation der SH-Gruppen in Enzymen, die notwendig oder nicht notwendig sind für die Aufrechterhaltung der Aktivität, mag diese Methode ihre Berechtigung haben. Für Ferredoxin dagegen fehlt das letzte Kriterium einer brauchbaren S-Schutzgruppe, nämlich die vollständige Deblockierung.

Eine weitere mögliche Schutzgruppe bietet die Oxidation der Protein-SH-Gruppen zu gemischten Disulfiden mittels Substanzen wie 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoat), Arylsulfo-

nylhalogenide, Quecksilber, Na_2SO_3, wobei die S-Sulfonierung bei weitem die besten Ergebnisse erzielte.

Cole empfiehlt dazu die Verwendung von $CuSO_4$ in Verbindung mit Na_2SO_3. (52,53) Er konnte damit bei der Aldolase eine 100%ige Sulfonierung erreichen, wobei die Kupferionen als oxidierendes Agenz gebraucht werden.



Dagegen beschreibt Chan eine neue Methode zur vollständigen Sulfonierung von Protein-SH-Gruppen unter milden Bedingungen (54), indem das Protein mit Na_2SO_3 und katalytischen Mengen von Cystein in Gegenwart von Sauerstoff und 8 m Harnstoff behandelt wird. Wie der Versuch mit Muskelaldolase zeigt, konnte eine vollständige Sulfonierung nach 1 Stunde erzielt werden. Die Reaktion verlief spezifisch für die SH-Gruppen, wobei die Aldolase ihre enzymatische Aktivität verlor, die jedoch nach der Behandldung mit ß-Mercaptoäthanol wieder voll hergestellt werden konnte. Die 100%ige Regeneration der enzymatischen Aktivität zeigt, daß die Methode brauchbar ist für Studien, die eine Wiederherstellung der biologischen Aktivität verlangen. Zwar wurde diese Methode noch nicht oft bei Proteinen angewandt, die SH-

Gruppen, aber keine Disulfid-Brücken besitzen, jedoch findet die gleiche Reaktion statt, gleichgültig, ob Disulfid-Brücken vorhanden sind oder nicht, da in beiden Fällen für die vollständige Sulfonierung die Oxidation verlangt ist; dabei ist der Mechanismus dieser Reaktion bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Sicher jedoch ist, daß die Gegenwart von SH-Komponenten, wie Cystein und molekularer Sauerstoff, vom Beginn der Reaktion an notwendig ist; deshalb wird mit größter Wahrscheinlichkeit das Zwischenprodukt bei dieser Reaktion nicht Protein-Protein Disulfid sein, sondern das gemischte Disulfid aus Cystein und Protein-SH. Außerdem weist die Beobachtung, daß Cystein zwar durch ß-Mercaptoäthylamin aber nicht durch ß-Mercaptoäthanol ersetzt werden kann, auf die Wichtigkeit einer protonierten Nachbaramino-gruppe hin. Di-Sulfidmoleküle mit positiver Ladung unterliegen, wie McPhee (55) zeigen konnte, wesentlich schneller einer Sulfitolyse.

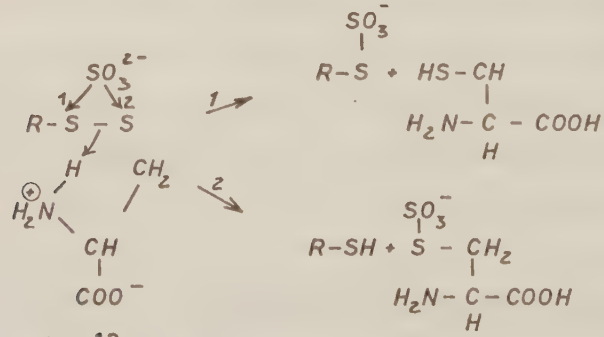


Abb.: 13

Der mögliche Einfluß von Cystein bei der Sulfonierungsreaktion.

2.1.4.1. S-Sulfonierung der Apoferredoxine

Da die S-Sulfonierung eine selektive und reversible Schutzgruppe für alle Cysteinreste in Proteinen zu sein scheint, wird nun versucht, diese beiden Methoden auf Ferredoxin zu übertragen, dessen 8 Cysteinreste zum einen mit Na_2SO_3 + $CuSO_4$ zum anderen mit Na_2SO_3 + Cystein vollständig sulfoniert werden sollen. Eine genaue Kontrolle der Reaktionsausbeute wird durch die Verwendung radioaktiv markierter $Na_2{}^{35}SO_3$-Lösung (1 µMol = 20800 cpm) ermöglicht, wobei bei 1 mg vollsulfoniertem Apoferredoxin, nach Abtrennung des überschüssigen Sulfits mittels Säulenchromatographie 27 800 cpm erwartet werden. Ein "Quenching" der Scintillationsausbeute durch den Proteinanteil konnte durch Vorversuche ausgeschlossen werden.

	$CuSO_4$-Methode		Cystein - Methode	
	clost. past.	clost. ac. ur.	clost. past.	clost. ac. ur.
Reaktionszeit bei 20° C [Std.]	2	2	2	2
Reaktionszeit bei 5°C [Std.]	-	-	-	-
Sulfonierung [cpm/mg Protein]	9740	9456	11415	11984
Sulfonierung [%]	35	34	41	43
Resynthese vor Entfernen des übersch. Sulfits [%]	-	-	-	-
Resynthese nach Enfernen des übersch. Sulfits [%]	34	37	50	55
Reaktionszeit bei 20°C [Std.]	2	2	2	2
Reaktionszeit bei 5° C Std.	22	22	22	22
Sulfonierung. cpm/mg Protein	27821	27915	28010	27793
Sulfonierung [%]	100	100	100	100
Resynthese vor Entfernen des übersch. Sulfits [%]	5	8	6	10
Resynthese nach Entfernen des übersch. Sulfits [%]	35	38 4	58	60

Abb.: 14

Sulfonierungsexperimente mit Apo ferredoxin aus Clostridium pasteurianum (clost. past.) und clostridium acidiurici (clost. ac.uv.) bei zwei verschiedenen Reaktionszeiten.

Für die Sulfonierung der Apoferredoxine (Clost. past. und Clost. acidi u.) sowohl mit $CuSO_4$ als auch mit Cystein zeigte sich, wie aus der Tabelle (Abb.: 4) ersichtlich wird, die empfohlene Reaktionszeit von 2 Stunden als viel zu kurz für eine vollständige Sulfonierung; sie konnte in beiden Fällen erst nach 24 Stunden (2 Stunden bei Zimmertemperatur und 22 Stunden bei 5°C) erreicht werden. Die 100 %ige Sulfonierung ist insofern abgesichert als nach Abtrennung des im Überschuß zugesetzten Sulfits, selbst nach mehrmaliger sorgfältiger Chromatographie an G-25 Sephadexsäulen (Abb.: 15,16), die gleiche Anzahl von radioaktiven Zerfällen pro mg Apoferredoxin registriert werden konnte. Prüft man in Gegenwart von Harnstoff und Mercaptoäthanol die Resynthesefähigkeit der so sulfonierten Apoferredoxine, so wird deutlich, daß vor Entfernen des überschüssigen Sulfits die Resynthese maximal zu 10 % verläuft. Entfernt man dagegen das überschüssige Sulfit durch Chromatographie an Sephadexsäulen, so konnte unter den gleichen Bedingungen bis zu 60 % resynthetisiertes Ferredoxin gewonnen werden.

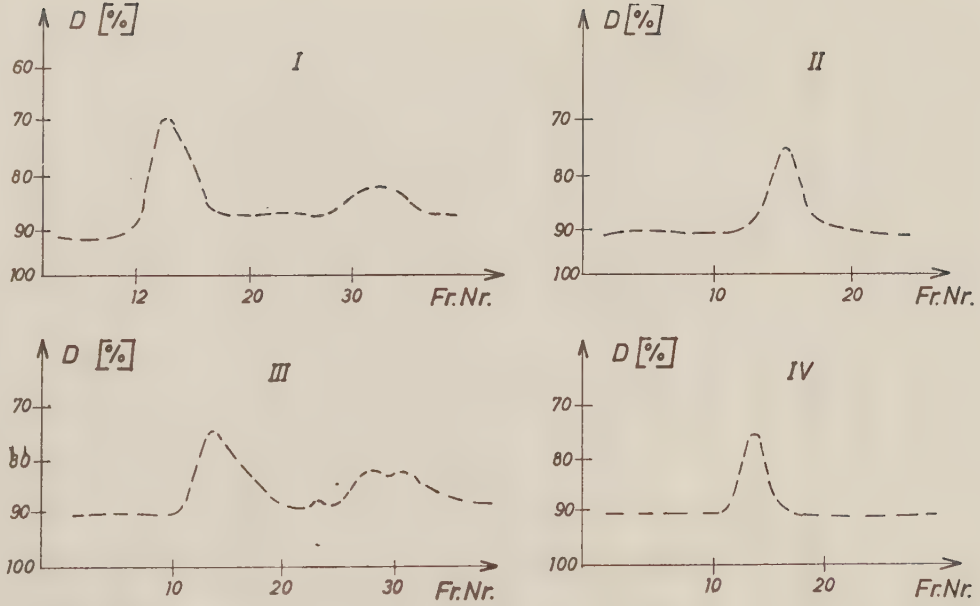


Abb.: 15

Elutionsdiagramme

Sulfoniertes Apoferredoxin von Clost. acidi urici wird an G_{25} Sephadexsäulen (100x3cm) gereinigt.

I 1. Chromatographie
II 2. Chromatographie
> sulfoniert mit Cystein + Na_2SO_3

III 1. Chromatographie
IV 2. Chromatographie
> sulfoniert mit $CuSO_4$ + Na_2SO_3

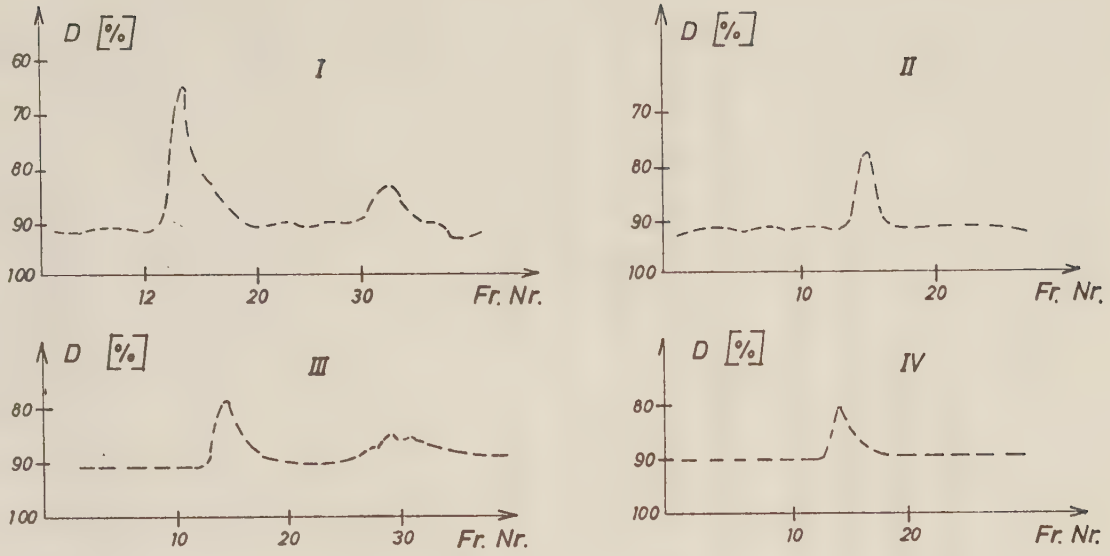


Abb.: 16

Elutionsdiagramme

sulfoniertes Apoferredoxin von Clostridium pasteurianum wird an G_{25} Sephadexsäulen (100 x 3 cm) gereinigt.

I 1. Chromatographie
II 2. Chromatographie
> sulfoniert mit Cystein + Na_2SO_3

III 1. Chromatographie
IV 2. Chromatographie
> sulfoniert mit $CuSO_4$ + Na_2SO_3

2.1.5. Darstellung von natürlichen Fragmenten

Als Ausgangsprodukt für die Darstellung natürlicher Fragmente aus dem Gesamtprotein dient zunächst das vollsulfonierte Aopferredoxin aus Clostridium acidi urici, da bei diesem Protein durch die Spaltung mit Trypsin nur 2 Fragmente (T_1 : 1-28, T_2 : 29-55) erwartet werden. Diese Tatsache erleichtert nämlich wesentlich die prinzipiellen Untersuchungen über die Brauchbarkeit des gewählten Semisynthesewegs.

Zur Durchführung dieser Reaktion wird das sulfonierte Apoferredoxin in Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst, mit Trypsin versetzt und die Spaltung durch Titration mit NaOH am pH-Stat verfolgt, die, wie aus der Kurve (Abb.: 17) ersichtlich wird, nach etwa 3 Stunden beendet ist.

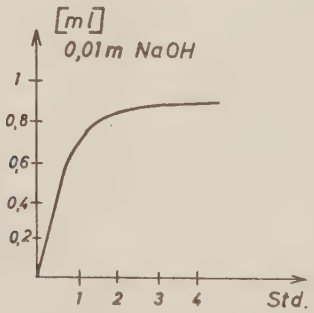


Abb.: 17
Titrationskurve
54,6 mg sulfoniertes Apoferredoxin wird mit 0,2 ml Trypsin (10 mg/ml 0,001n HCl) gespalten Die frei werdenden COOH - Gruppen werden mit NaOH titriert.

Ein Beweis für die vollständige Spaltung des Gesamtproteins an Arginin gelingt mit Carboxypeptidase B. Dieses Enzym spaltet das durch Trypsin freigelegte Arginin ab. Ein Vergleich dieser Argininmenge mit der aus der Totalhydrolyse gewonnenen erlaubt eine quantitative Aussage über den Verlauf der Spaltung.

In diesem Fall erreicht der Carboxypeptidase Argininwert (Abb.: 18) den der Totalhydrolyse. Das heißt, die Spaltung an Position 29 ist vollständig verlaufen.

	µMol Arg.
Totalhydrolyse	0,168
Carboxypeptidase	0,166

Abb.: 18

Carboxypeptidase Test

Um zu zeigen, daß die Spaltung nur bei Arginin stattgefunden hat ohne weitere Fragmentierungen, werden mit Hilfe des Edman-Abbaus die N-endständigen Aminosäuren des Peptidgemisches identifiziert. Die Aminogruppe des Peptids wird bei pH 8 - 9 mit Phenylisothiocyanat zur Reaktion gebracht; das entstehende Derivat spaltet bei saurer Reaktion den endständigen Rest als substituiertes Thiohydantoin ab (Abb.: 19), das durch Chromatographie identifiziert werden kann.

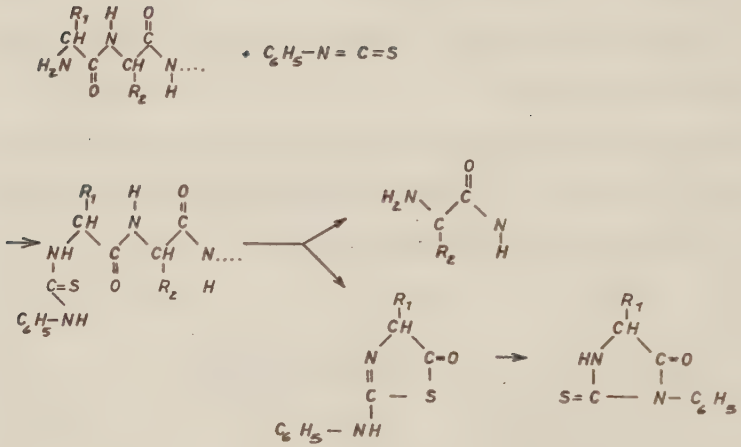


Abb.: 19
Edmanabbau

Sind nur die erwarteten 2 Bruchstücke T_1 und T_2 vorhanden, müssen Alanin und Tyrosin als 3-Phenyl-2-thiohydantoinderivate (PTH) abgespalten werden, die dann auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator und Vergleichs-PTH-Aminosäuren chromatographiert und im UV-Licht bei 254 nm nachgewiesen werden können.

Abb.: 20

Chromatographie auf Kieselgel-platten mit Fluoreszenzindikator
Laufmittel: Chloroform (n-Butanol) (100 : 1)

A Edmanabbau vom trypsin-gespaltenen sulfonierten Apoferredoxin zur Bestimmung der N-endständigen Aminosäuren.

B PTH - Alanin Vergleichsaminosäure

C PTH - Tyrosin Vergleichsaminosäure

Aus den Chromatogrammen (Abb.: 20) geht eindeutig hervor, daß das Peptidgemisch nur aus 2 Bruchstücken mit Alanin und Tyrosin als N-endständige Aminosäuren besteht.

2.1.6. Resyntheseversuche

Da sowohl der Carboxypeptidasetest als auch der Edmanabbau die vollständige Spaltung des Gesamtproteins in zwei

Fragmente bestätigten, liegt es nun daran zu prüfen, in wie weit das Fragmentgemisch, das N-terminale und das C-terminale Bruchstück enthaltend, zur Resynthese des biologisch aktiven Enzyms in der Lage ist.

Das Ergebnis dieses Versuchs war verblüffend. Nach Zugabe von Fe^{3+} und Sulfid konnte resynthetisiertes Ferredoxin zu 49 % mit E 390/E 285 = 0,74 isoliert werden.

Eine Resynthese ist also möglich ohne Kupplung der beiden Bruchstücke. Die Peptidbindung Arginin-Tyrosin ist demzufolge nicht notwendig für die Aktivität dieses Proteins, sondern trägt nur zur Stabilität des Gesamtproteins bei. Diese Annahme konnte hier spektroskopisch bewiesen werden. Spaltet man nämlich natives Ferredoxin mit Trypsin, so ändert sich am Gesamtspektrum des Proteins zunächst nichts. Vergleicht man jedoch die Spektren vom nativen und trypsingespaltenen Ferredoxin, nachdem die beiden Proben 6 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt waren, so sieht man deutliche Unterschiede (Abb.: 21), die sich auch im Extinktionsverhältnis bemerkbar machen. (56)

	E 390/E 285
Nicht trypsinbehandeltes Ferredoxin nach 6 Stunden Inkubation bei 20°C	0,64
Trypsinbehandeltes Ferredoxin nach 6 Stunden Inkubation bei 20°C	0,21

Orme-Johnson konnte später sogar zeigen, daß die isolierten Trypsinspaltstücke, jedes für sich, fähig sind, natives Ferredoxin zu 10 % zu resynthetisieren. (57)

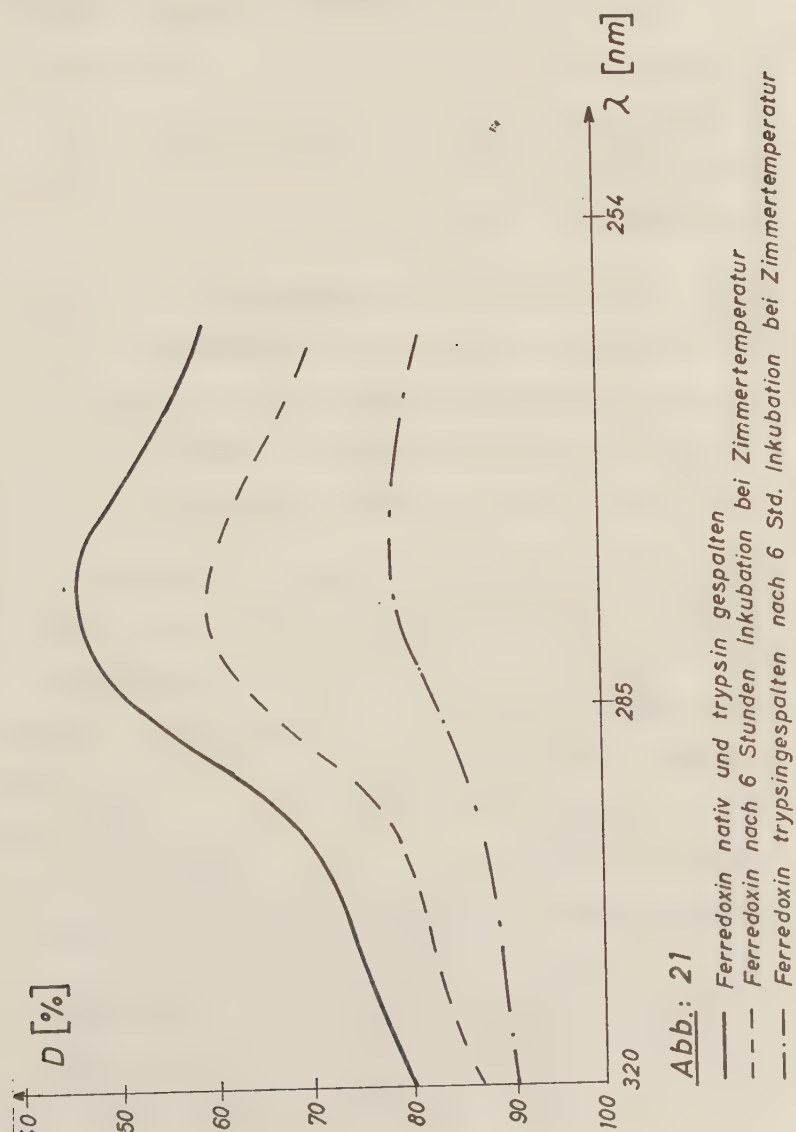


Abb.: 21

——— Ferredoxin nativ und trypsin gespalten
– – – Ferredoxin nach 6 Stunden Inkubation bei Zimmertemperatur
—·— Ferredoxin trypsingespalten nach 6 Std. Inkubation bei Zimmertemperatur

2.1.7. Der Einfluß von Bromwasserstoff, Trifluoressigsäure und Fluorwasserstoff auf die Resynthesefähigkeit von Apoferredoxin

Um eine gezielte Kupplung der beiden Fragmente T_1 und T_2 zu erreichen, ist nicht nur die reversible Blockierung der Cystein SH-Gruppen, sondern auch der übrigen trifunktionellen Aminosäuren vonnöten.

Bei der Totalsynthese von Apoferredoxin wurden die ß- und γ-Carboxylgruppen der Asparagin- und Glutaminsäure, ebenso wie die OH-Gruppen des Serins, Tyrosins und Threonins benzylgeschützt und nach Beendigung der Synthese mit HF oder HBr/Trifluoressigsäure wieder deblockiert.

Bevor mit der Blockierung der restlichen trifunktionellen Aminosäuren begonnen werden kann, muß zunächst der Einfluß der Abspaltungsreagenzien HBr/Trifluoressigsäure und HF auf die Resynthesefähigkeit des Apoproteins untersucht werden, da zwar die durch Trypsinspaltung erhaltenen S-sulfonierten Fragmente, nicht aber die auf dem Wege der Totalsynthese hergestellten vollblockierten Teilsequenzen, nach Abspaltung der Schutzgruppen, zur Resynthese fähig waren.

Wir konnten hier zeigen, daß selbst natives Apoferredoxin weder nach HBr/Trifluoressigsäure noch nach HF-Behandlung in der Lage war, Ferredoxin zu resynthetisieren.

Da keine schonenderen Abspaltungsmethoden zur Verfügung stehen, lassen diese Ergebnisse klar erkennen, daß Ferredoxin für grundlegende Untersuchungen eines Semisyntheseswegs, nämlich

- Blockierung der reaktiven Seitengruppen
- Darstellung geeigneter Fragmente
- Kupplung der Fragmente
- Abspaltung der Schutzgruppen
- Resynthese

nicht geeignet ist.

2.1.8. Ergebnisse

Ferredoxin, ein Eisen enthaltendes Protein, bestehend aus 55 Aminosäureresten, wird aus den Bakterienzellen Clostridium acidi urici gewonnen. Mittels Ultraschallbehandlung werden die Zellwände zerstört und nach der Zentrifugation Ferredoxin durch mehrmalige Chromatographie rein gewonnen. Die Darstellung des Apoproteins gelingt mit Eisenkomplexbildner wie a,a'-Dipyridyl oder Trichloressigsäure. Aus diesem Apoferredoxin läßt sich in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol, Fe^{3+} und Natriumsulfid Ferredoxin resynthetisieren.

Die Semisynthese von Ferredoxin beginnt mit der Blockierung der 8 Cysteinreste im Apoferredoxin. Sie ist notwendig wegen der starken Nucleophilie und leichten Oxidierbarkeit der SH-Gruppen. Als beste selektive und reversible S-Schutzgruppe erwies sich die S-Sulfonierung mit Na_2SO_3 + $CuSO_4$ oder Na_2SO_3 + Cystein, deren quantitativer Verlauf mittels radioaktiver Markierung (^{35}S) bestätigt werden konnte. Aus dem S-sulfonierten Produkt kann nach der Abspaltung der Schutzgruppen mit Mercaptoäthanol zu 60 % Ferredoxin resynthetisiert werden.

Um natürliche Proteinfragmente zu erhalten, wurde das S-sulfonierte Apoferredoxin mit Trypsin gespalten und man erhält durch den Argininrest an Position 29 2 Fragmente T_1 : 1 - 29, T_2 : 30 - 55. Die vollständige Spaltung des Gesamtproteins konnte mittels Carboxypeptidaseverdauung nachgewiesen werden.

Das Fragmentgemisch T_1 und T_2 ist in der Lage, ohne Kupplung nach Zugabe von Fe^{3+} und Sulfid und Abspaltung der S-Schutzgruppen zu 49 % natives Ferredoxin mit einem Extinktionsverhältnis von 0,74 zu resynthetisieren.

Die zur Semisynthese notwendige Blockierung der restlichen reaktiven Seitengruppen ist nicht möglich, da die Abspaltung dieser Schutzgruppen mit HF oder HBr/Trifluoressigsäure nicht gelingt, ohne das Protein irreversibel zu denaturieren.

2.2. Untersuchungen an Myoglobin

2.2.1. Einführung, spezielle Problematik und Synthesestrategie

Myoglobin vom Pferd, das für die hier durchgeführten Untersuchungen verwendet wurde, ist ein biologisch aktives Protein mit 153 Aminosäuren, deren Sequenz aufgeklärt ist. (Abb.: 22) Aktiv deshalb, weil Myoglobin reversibel Sauerstoff zu binden vermag unter Mitwirkung der Eisen enthaltenden prosthetischen Gruppe Hämin. (58) Im Eisen-Porphyrin-Komplex Hämin sind 4 Koordinationsstellen des Eisens durch die planar angeordneten Stickstoffatome der Pyrollkerne besetzt (59), die 5. Position wird durch die koordinative Bindung des Eisens an den Imidazolring des F-8-Histidins der Peptidkette eingenommen, während die 6. Koordinationsstelle beim Myoglobin frei ist für die reversible Aufnahme von Sauerstoff.

Myoglobin vom Pferd ist für Syntheseversuche aus Fragmenten besonders geeignet, da es neben dem Vorteil, keine Disulfidbrücken zu besitzen, auch die wichtigste Voraussetzung für die Semisynthese erfüllt, nämlich die Darstellungsmöglichkeit geeigneter Fragmentoligopeptide aus dem Gesamtprotein. Es enthält zwei Argininreste in Position 31 und 118, weshalb die proteolytische Wirkung von Trypsin (60) ausgenützt werden kann. Dieses Enzym besitzt ein Höchstmaß an Spezifität

in der Katalyse der Peptidbindungsspaltung, so daß 3 definierte Bruchstücke vom Myoglobin erhalten werden können. Zum zweiten bietet sich dann eine gute Möglichkeit zu prüfen, ob oder in wie weit, die Semisynthese fähig ist, das biologisch aktive Protein mit seinem hohen Helixgehalt und der typischen Einlagerung von Hämin aus Fragmenten wieder herzustellen.

Voruntersuchungen

Da die Semisynthese ein Zweistufenprozeß ist, nämlich

- Darstellung geeigneter Fragmente
- Kupplung der Fragmente

und da eine gezielte Kupplung nur stattfinden kann, wenn alle reaktiven Seitengruppen der Proteinfragmente blockiert sind, wird zunächst am Gesamtprotein versucht, für die freien Amino- und Carboxylgruppen geeignete Schutzgruppen zu finden, die unter peptidschonenden, also milden Reaktionsbedingungen quantitativ eingeführt und abgespalten werden können. (61)

Dazu wird zunächst durch Entfernen der prosthetischen Gruppe von Myoglobin das Apoprotein hergestellt. Durch die Aufhebung der Wechselwirkungen zwischen Globin und Hämin im sauren Medium (62) ändert sich die Konformation des Moleküls.

Der festgestellte Verlust an α-Helix und die Volumenzunahme (63,64,65) kann als Aufweitung des Moleküls interpretiert werden, dessen reaktive Seitenketten in diesem Zustand eher blockiert werden können.

Als zweites wird geprüft, ob das voll blockierte Protein nach Abspaltung der Schutzgruppen in der Lage ist, durch Rekombination mit Hämin das ursprüngliche Myoglobin wieder herzustellen. Ist das der Fall, so kann man sicher sein, daß die angewandten Methoden der Schutzgruppeneinführung und Abspaltung das Protein nicht irreversibel denaturiert haben.

Semisynthese

1. NH_2-Blockierung

Alle reaktiven Aminogruppen des Gesamtapoproteins werden durch Trifluoracetylierung blockiert. (66) Die Guanidinogruppe des Arginins und die Imidazolgruppe des Histidins bleiben dabei jedoch unverändert. (67)

2. Trypsin-Spaltung

Da die Lysinbindungen im Molekül durch ihre Aminoschutzgruppen unempfindlich gegenüber tryptischer Verdauung geworden sind, erhält man nach der Einwirkung des Enzyms

Trypsin auf das TFA-Apoprotein 3 definierte Spaltstücke

$TFA\text{-}T_1$: 1 - 31

$TFA\text{-}T_2$: 32 - 139

$TFA\text{-}T_3$: 140 - 153

Die Trypsinspaltung nach der Trifluoracetylierung des Gesamtproteins hat zwei entscheidende Vorteile:

- Die Fragmente aggregieren durch die Blockierung der NH_2-Gruppen nicht mehr so leicht. Dadurch können sie sicher und besser isoliert werden.

- $TFA\text{-}T_2$ und $TFA\text{-}T_3$ haben nach der Spaltung mit Trypsin eine freie End-Aminogruppe, die nötig ist für die spätere Kupplung der Fragmente. Eine gezielte Entfernung einer bestimmten TFA-Gruppe dürfte ziemlich schwierig sein.

3. Trennung der Fragmente

Die Spaltstücke $TFA\text{-}T_1$, $TFA\text{-}T_2$ und $TFA\text{-}T_3$ werden durch mehrmalige Gelfiltration getrennt und nach ihrer Isolierung mittels Aminosäureanalyse charakterisiert.

4. COOH-Blockierung

Hat man nun die Fragmente isoliert, müssen noch die freien Carboxylgruppen blockiert werden. Neben der

leichten Einführung und Abspaltung müssen die Carboxylschutzgruppen noch zusätzliche Bedingungen erfüllen. Die Abspaltung der Schutzgruppe von der Carboxylgruppe der Arginine, die zur Kupplung eingesetzt werden, muß selektiv sein, ohne den anderen Seitenkettenschutz zu zerstören. Da anzunehmen ist, daß die Löslichkeit der Peptide in wäßrigem Medium mit zunehmender Blockierung der funktionellen Seitengruppen nachläßt, ist bei Verwendung von Trypsin für die selektive Abspaltung der Carboxylschutzgruppe ein Lösungsmittel zu finden, das sowohl die Peptide löst, als auch die Trypsinaktivität nicht entscheidend beeinträchtigt.

Auch die Blockierung der COOH-Gruppen am Gesamtprotein wäre prinzipiell möglich, jedoch ist das vollblockierte Gesamtprotein mit Sicherheit in keinem Lösungsmittel löslich, in dem Trypsin aktiv ist. Eine Spaltung mit diesem Enzym wäre damit unmöglich.

5. Kupplung von TFA-T_1 und TFA-T_2

Die vollgeschützten Fragmente TFA-T_1 und TFA-T_2 sollen zunächst gekuppelt werden, die zusammen 90 % der Gesamtaminosäuren und 94 % des Gesamthelixgehaltes besitzen. Wie unveröffentlichte Arbeiten von H. Hagenmaier über isolierte Pferdemyoglobinfragmente zeigten,

werden durch die Trypsinspaltung die Bruchstücke unter Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur aus dem Molekülverband herausgelöst.

T_1, das N-terminale Fragment mit 31 Aminosäuren, zeigt in Wasser eine große Neigung zur Aggregation (68), die möglicherweise eine zentrale Rolle im Anführen der Faltung spielt, und T_2 besitzt die Bindungsstelle für das Porphyrineisen und ermöglicht durch seine 107 Aminosäurereste langkettige interhelicale Wechselwirkungen, die für die Bestimmung der Konformation eine wichtige Rolle spielen.

6. Abspaltung der Schutzgruppen

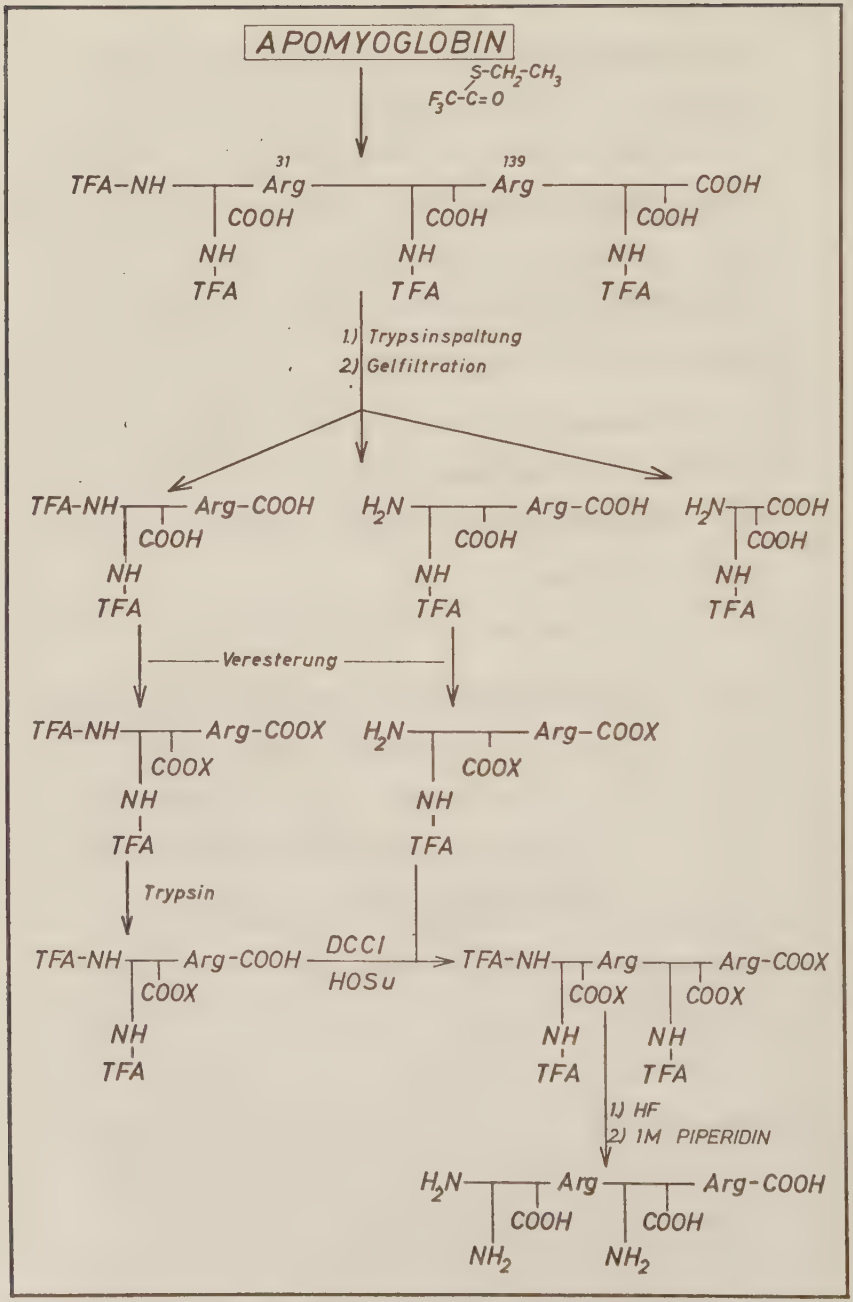
Vom isolierten gekuppelten Produkt werden die Amino- und Carboxylgruppen abgespalten.

7. Einlagerung von Hämin

Da die thermodynamische Hypothese vom Konformationsstatus eines Proteins davon ausgeht, daß die Aminosäuresequenz ausreicht, um die Sekundär- und Tertiärstruktur zu bestimmen, müssen es also die nichtkovalenten und sterischen Bindungseigenschaften der Poly-α-Aminosäurenseitenketten sein, die für die Ausbildung der α-Helix, random coil oder ausgestreckte Form verantwortlich sind. (69,70)

Nun soll geprüft werden, ob das gekuppelte Produkt TFA-T_1 —— TFA-T_2, das 90 % der Gesamtaminosäuren besitzt und deren Sequenz exakt identisch ist mit dem natürlichen Protein nach Abspaltung der Schutzgruppen, in der Lage ist, durch Rekombination mit Hämin die Eigenschaften ursprünglichen Myoglobins wieder herzustellen. Das heißt:

- Wiedergewinnung des hohen Helixgehaltes durch die Kupplung.
- Erhöhung des Helixgehalts durch Einlagerung von Hämin.
- 1:1 Komplexbildung mit Hämin.
- Das typische high-spin Spektrum von Desoxymyoglobin muß erhalten werden. T_2 lagert zwar als einziges Trypsinfragment Hämin in einem 1:1 Komplex an, zeigt aber ein typisches Hämochromogenspektrum (Low-spin).


APOMYOGLOBIN
S-CH2-CH3
F3C-C=O
TFA-NH
31
Arg
139
Arg
COOH
NH
TFA
1.) Trypsinspaltung
2.) Gelfiltration
H2N
Arg-COOH
Veresterung
COOX
Trypsin
DCCI
HOSu
1.) HF
2.) 1M PIPERIDIN
NH2

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)
NA1	2	A1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	A16
gly	leu	ser	asp	gly	glu	trp	gln	glu	val	leu	asn	val	trp	gly	lys	val	glu

(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	(31)	(32)	(33)	(34)	(35)	(36)
AB1	B1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	C1
ala	asp	ilc	ala	gly	his	gly	gln	glu	val	leu	ilu	arg	leu	phe	thr	gly	his

(37)	(38)	(39)	(40)	(41)	(42)	(43)	(44)	(45)	(46)	(47)	(48)	(49)	(50)	(51)	(52)	(53)	(54)
C2	3	4	5	6	7	CD1	2	3	4	5	6	7	8	D1	2	3	4
pro	glu	thr	leu	glu	lys	phe	asp	lys	phe	lys	his	leu	lys	thr	glu	ala	glu

(55)	(56)	(57)	(58)	(59)	(60)	(61)	(62)	(63)	(64)	(65)	(66)	(67)	(68)	(69)	(70)	(71)	(72)
D5	6	7	E1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
met	lys	ala	ser	glu	asp	leu	lys	lys	his	gly	thr	val	val	leu	thr	ala	leu

(73)	(74)	(75)	(76)	(77)	(78)	(79)	(80)	(81)	(82)	(83)	(84)	(85)	(86)	(87)	(88)	(89)	(90)
E16	17	18	19	20	EF1	2	3	4	5	6	7	8	F1	2	3	4	5
gly	gly	ilu	leu	lys	lys	lys	gly	his	his	glu	ala	glu	leu	lys	pro	leu	ala

(91)	(92)	(93)	(94)	(95)	(96)	(97)	(98)	(99)	(100)	(101)	(102)	(103)	(104)	(105)	(106)	(107)	(108)
F6	7	8	9	FG1	2	3	4	5	G1	2	3	4	5	6	7	8	9
gln	ser	his	ala	thr	lys	his	lys	ilu	pro	ilu	lys	tyr	leu	glu	phe	ilu	ser

(109)	(110)	(111)	(112)	(113)	(114)	(115)	(116)	(117)	(118)	(119)	(120)	(121)	(122)	(123)	(124)	(125)	(126)
G10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	GH1	2	3	4	5	6	H1	2
asp	ala	ilu	ilu	his	val	leu	his	ser	lys	his	pro	gly	asn	phe	gly	ala	asp

(127)	(128)	(129)	(130)	(131)	(132)	(133)	(134)	(135)	(136)	(137)	(138)	(139)	(140)	(141)	(142)	(143)	(144)
H3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ala	gln	gly	ala	met	thr	lys	ala	leu	glu	leu	phe	asn	lys	asp	ilu	ala	ala

(145)	(146)	(147)	(148)	(149)	(150)	(151)	(152)	(153)
H21	22	23	24	HC1	2	3	4	5
lys	tyr	lys	glu	leu	gly	phe	gln	gly

Abb.: 22
Aminosäuresequenz des Pferdemyoglobins

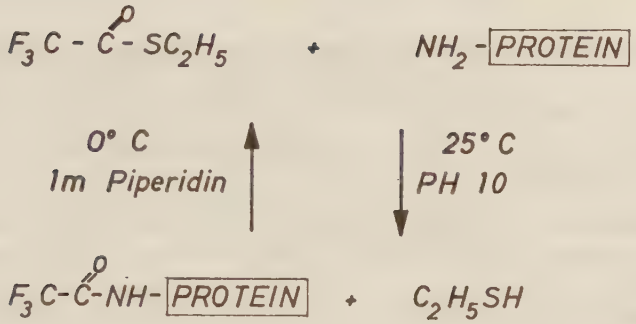
2.2.2. Untersuchungen zur Verwendung von Schutzgruppen

2.2.2.1. Aminoschutzgruppen

2.2.2.1.1. Einführung der Trifluoracetylgruppe

Im Gegensatz zu allen anderen Methoden der Peptidchemie, die die ε-Aminogruppen in Proteinen durch Fluordinitrobenzol (71), Carbobenzoxychlorid (72) oder Carbondisulfid (73) schützen, soll die Trifluoracetylierung zum Schutz der freien α- und ε-Aminogruppen ein reversibler Prozeß sein, der ohne Racemisierung verläuft. Da die Methode der Trifluoracetylierung je nach Bedarf variiert werden kann (74), wird nun untersucht, unter welchen Bedingungen die freien Aminogruppen des Myoglobins (20 Lysinreste, 1 N-terminale Aminogruppe) mit dieser Schutzgruppe vollständig und reversibel blockiert werden können.

Apomyoglobin hat keine Disulfidbrücken und somit kann die TFA-Gruppe mittels des Standard-Reagenz Äthylthioltrifluoracetat bei p_H10 eingeführt werden. (67)



Das dabei anfallende Mercaptoäthanol wird durch Dialyse entfernt und man erhält nach der Gefriertrocknung ein weißes, im Neutralbereich wasserlösliches Produkt (Ausbeute: 87 %).

Von allergrößter Wichtigkeit ist es natürlich nun festzustellen, wieviel dieser Aminogruppen durch die Trifluoracetylierung blockiert wurden; dabei wird die Tatsache ausgenützt, daß bei TFA-Apomyoglobin die Lysinbindungen gegen tryptische Verdauung stabil sind, während die Argininbindungen gespalten werden. Erfolgt nach der Trypsinbehandlung eine Verdauung mit Carboxypeptidase B, die als Exopeptidase carboxylendständige basische Aminosäuren abspaltet, so wird die Aminosäureanalyse im Fall der vollständigen Blockierung nur Arginin zeigen.

	eingesetzte Menge [mg]	µ Mol. Lysin	µ Mol. Arginin	Verhältnis Lys. : Arg.	theor. Verh. Lys.: Arg.
Trypsin + Carboxypeptidase	0,5	0,055	0,073	0,69 : 1	0 : 1
Totalhydrolyse	0,5	0,864	0,08	10,8 : 1	10 : 1

Abb.: 23

Quantitative Auswertung der Triflouracetylierung mittels Aminosäureanalyse.

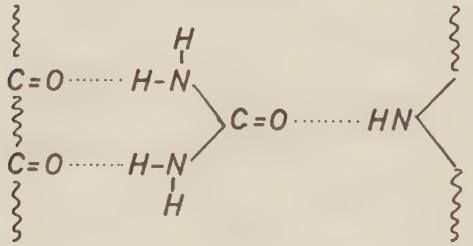
Vergleicht man die erzielten Verhältniswerte mit denen der Theorie (Abb.: 23), so wird deutlich, daß die Trifluoracetylierung bei Myoglobin eine hervorragende Methode ist, um sämtliche reaktiven Aminogruppen zu blockieren.

2.2.2.1.2. Abspaltung der Trifluoracetylgruppe

Ebenso wie die Einführung sollte auch die Entfernung der Schutzgruppe einfach und vollständig sein, da nur so die für die Bildung der Sekundär- und Tertiärstruktur notwendigen intramolekularen Wechselwirkungen gewährleistet sind.

Die Abspaltung erfolgt bei 0°C in 1 m Piperidin, wobei gleichzeitig der Einfluß von 8 m Harnstoff auf die Abspaltungsrate untersucht werden soll. Harnstoff, der selbst leicht intramolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden kann, löst die noch bestehenden des Proteins, indem er sich sowohl an

die Wasserstoffatome der Amidgruppe als auch an die Sauerstoffatome der Carbonylgruppe anlagert.



Durch den totalen Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur streckt sich das Molekül, wobei der Angriff durch Piperidin erleichtert werden könnte. (75,76,77)
Zur Reinigung und Abtrennung von Piperidin und Harnstoff werden die Proteine über eine G-25 Sephadex-Säule (Gelfiltration) geschickt und anschließend einer Fluoranalyse unterworfen.

	ohne Harnstoff	mit Harnstoff
eingesetzte Menge [mg]	100	100
eluierte ml nach G_{25}-grob	100	100
Protein Konz. pro ml	0,7426	0,7295
Protein Konz. in 100 ml	74,26	72,95
Ausbeute [%]	74,26	72,95
Fluoranalyse [%]	0,43	0

Abb.: 24

Abspaltung der TFA-Gruppe

1. ohne Harnstoff

2. in Gegenwart von 8 m Harnstoff

Wie man aus den Tabellenwerten (Abb.: 24) entnehmen kann, gelingt die Abspaltung der TFA Gruppe in beiden Fällen. Offensichtlich ist jedoch, daß durch die Anwesenheit von Harnstoff das Ergebnis verbessert werden kann. So konnte nach der Abspaltung der TFA-Gruppe ohne Harnstoff nur noch 0,27 Mol Fluor pro Mol Myoglobin und in Gegenwart von Harnstoff überhaupt kein Fluor mehr nachgewiesen werden.

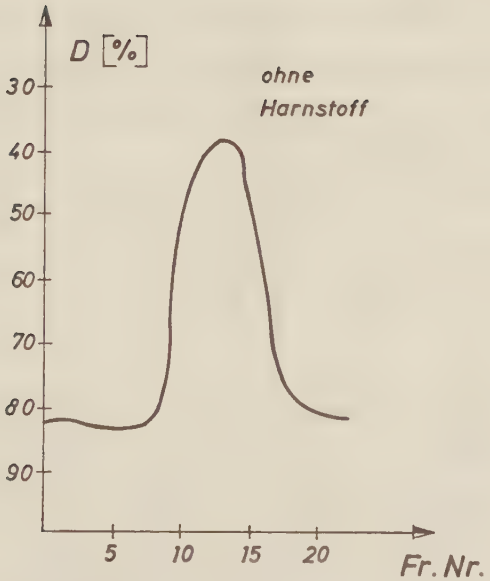


Abb.: 25

Elutionsdiagramm von Apomyoglobin nach der Abspaltung von TFA.
verwendete Säule: G_{25} grob
Sephadex (100 x 3 cm)
Elutionsmittel: 0,08m Borat

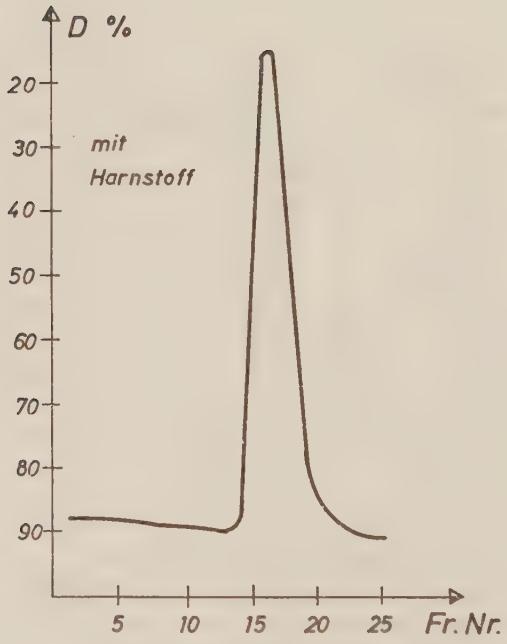


Abb.: 26

Elutionsdiagramm

von Apomyoglobin nach der Abspaltung von TFA.
Die Chromatographie wurde an einer G_{25} grob Sephadex Säule (100x3cm) durchgeführt.
Elutionsmittel : 0,08 m Borat

2.2.2.2. Carboxylschutzgruppen

2.2.2.2.1. Einführung des Benzylesters mit Phenyldiazomethan

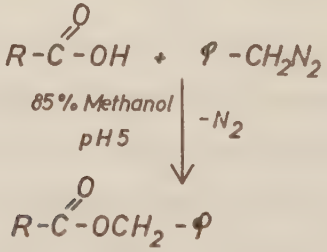
Um eine gezielte Kupplung durchführen zu können, müssen bei den später verwendeten Fragmenten nicht nur die freien Aminogruppen, sondern auch die ω-Carboxylgruppen der Glutamin- und Asparaginsäure blockiert werden.

Das Angebot an Carboxylschutzgruppen ist zwar mannigfaltig (78), jedoch ist ihre Anwendbarkeit auf größere Peptide und Proteine, die Carboxylgruppen unterschiedlicher Reaktivität haben, völlig unerforscht.

Den wichtigsten und einfachsten Carboxylschutz bietet die Estergruppe, wobei aber der Methyl- und Äthylester (79) für Proteine nicht in Frage kommen, da unter den Einführungsbedingungen dieser Ester die Aminoschutzgruppen angegriffen werden; außerdem stellt die quantitative Abspaltung dieser Schutzgruppen ein weiteres Problem dar.

Als nächstes wird deshalb die Brauchbarkeit des Benzylesters untersucht. Er war lange Zeit nach seiner Einführung durch Bergmann (80,81) die einzige Carboxyl-Schutzgruppe, die selektiv abgespalten werden konnte. Die Einführung dieses Esters mit Benzylalkohol (82) gelingt nur bei Aminosäuren gut, bei Proteinen jedoch verläuft die Reaktion nicht quantitativ und Peptidbindungsspaltung sind keine Seltenheit.

Hayward konnte bei der Veresterung seiner Produkte diese Schwierigkeiten durch Verwendung von Phenyldiazomethan (83) überwinden, das er aus Benzilmonohydrazon über Azibenzil dargestellt hat. (84,85) Im Gegensatz zu Myoglobin mit 153 Aminosäuren und 30 freien Carboxylgruppen hatten Hayward's Peptide maximal 11 Aminosäuren mit durchschnittlich zwei zu schützenden Carboxylgruppen und es bleibt nun zu untersuchen übrig, ob diese Methode auch beim Myoglobin zum Erfolg führt.



Die Veresterung von TFA-Apomyoglobin, die durch Zugabe von Phenyldiazomethan bei pH5 ausgeführt wird, kann am pH-Stat durch Titration mit Säure verfolgt werden, da das Verschwinden der freien Carboxylgruppen bei der Veresterung im pH-Anstieg zum Ausdruck kommt.

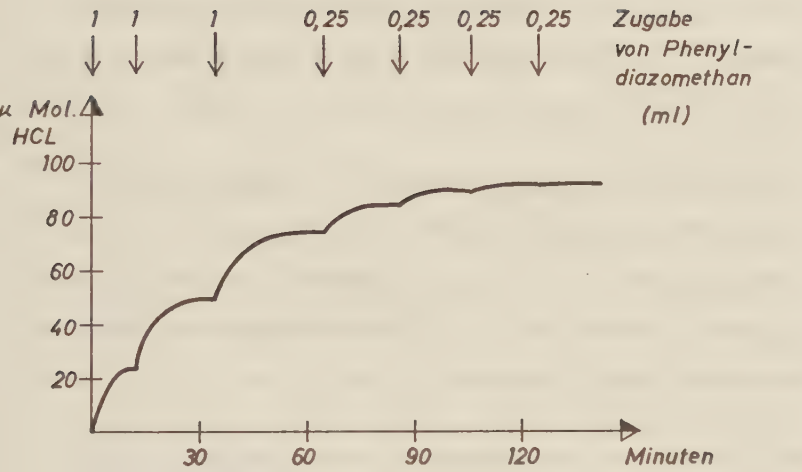


Abb.: 27

Titrationskurve

Veresterung von 50mg TFA-Apo mit Phenyldiazomethan

Wie man in Abbildung 27 sieht, unterliegt Phenyldiazomethan, obgleich im Überschuß zugegeben, einer Säurezersetzung, bevor die Veresterung beendet ist. Die rote Farbe von Phenyldiazomethan schlägt unter N_2-Entwicklung nach gelb um und neues Reaktionsmittel muß so lange hinzugefügt werden bis keine Salzsäure mehr verbraucht wird. Die Durchführungsvorschrift gleicht im wesentlichen der von Hayward bis auf einige Abweichungen, die vor allem zur Isolierung des veresterten Produkts nötig wurden. Das veresterte TFA-Apomyoglobin war zunächst weder in Pyridin/Wasser

1:1 noch in Pyridin löslich. Einzig durch das Auflösen in wenig 1,1,1,3,3,3, Hexafluoropropanol-2 und Verdünnen der Lösung vor der Gefriertrocknung mit Pyridin/Wasser, konnten 85 % des Produkts gewonnen werden.

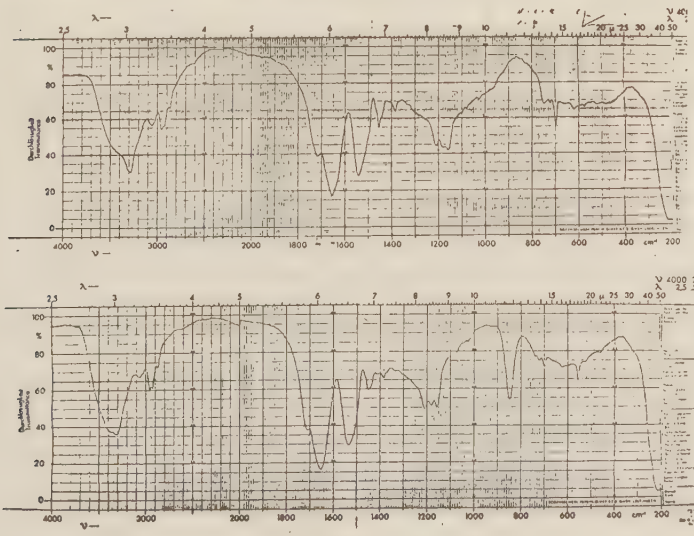
Diesem Experiment gingen Versuche zur Fällung des veresterten Produkts mit 3 % Natriumbicarbonat aus der Reaktionslösung voraus, die jedoch wegen des schwer zentrifugierbaren Niederschlags und einer Minimalausbeute nicht weiter untersucht wurden.

Eine quantitative Verfolgung der Veresterung ist nur möglich mittels einer enzymatischen Verdauung z.B. durch Pronase und Aminopeptidase M. Die durch die Einwirkung von Pronase, einem proteolytischen Enzym geringer Spezifität, erzeugten Oligopeptide werden dann durch Aminopeptidase M, die als Exopeptidase die Peptide vom Aminoende her angreift, zu den einzelnen Aminosäuren hydrolysiert. Diese beiden Enzyme sollten zusammen in der Lage sein, die Totalhydrolyse eines Proteins durchzuführen. (86)

Sind alle freien Carboxylgruppen verestert worden, so werden in den Aminosäureanalysen dieses Hydrolysats Glutamin- und Asparaginsäure fehlen, da die veresterten Aminosäuren ein völlig anderes Elutionsvolumen besitzen.

Zwar löste sich das veresterte TFA-Apomyoglobin nach der Gefriertrocknung in 60 % Pyridin , jedoch war, wie Versuche zeigten, weder Pronase noch Aminopeptidase M unter diesen Bedingungen aktiv.

Da auch die IR-Spektren (87) wegen der breiten Banden um 1600 nicht zum Beweis der Veresterung herangezogen werden konnten (Abb,: 28), spricht allein die extrem schlechte Löslichkeit in wäßrigen alkalischen Medien, bedingt durch den Schutz der funktionellen Seitengruppen im Molekül, und das titrierbare Verschwinden der freien Carboxylgruppen für eine gelungene Veresterung.



I

II

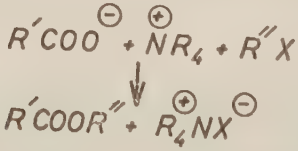
Abb.: 87 IR- Spektren

I TFA-Apomyoglobin

II Benzyliertes TFA-Apomyoglobin

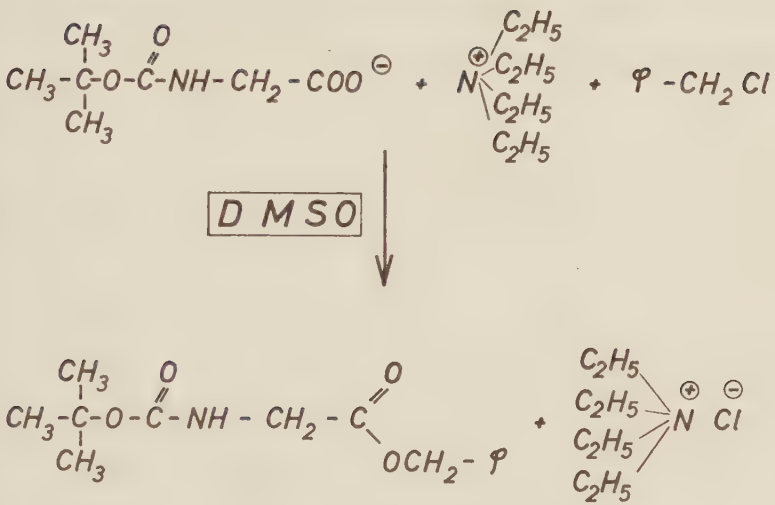
2.2.2.2.2. Einführung des Benzylesters mit Benzylchlorid

Die Einführung des Benzylesters mit Phenyldiazomethan erfordert wegen der schlechten Haltbarkeit dieses Reaktionsmittels und der schwierigen Gewinnung des veresterten Produkts einen erheblichen Aufwand und so wurde versucht, die von Wagenknecht (88) empfohlene einfache Veresterung von Säuren auf Myoglobin zu übertragen.



Als Lösungsmittel für seine Veresterungen mit Alkylhalogeniden und quartären Ammoniumionen wählte er stets DMF. Da aber die Löslichkeit von TFA-Apomyoglobin in DMSO entschieden besser war, sollte ein Vorversuch zeigen, ob auch dieses Lösungsmittel geeignet ist.

Als Testsubstanz diente Boc-Glycin, dessen endständige Carboxylgruppe verestert werden soll.



Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde die Veresterung dünnschichtchromatographisch verfolgt. (Abb.: 29) Das Chromatogramm zeigt deutlich die vollständige Veresterung. Die Ausgangssubstanz ist verschwunden.

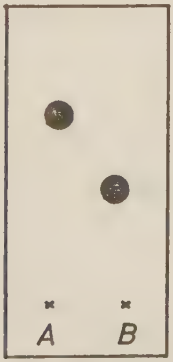


Abb.: 29

DC - Chromatographie

an einer Kieselgel - Platte (5x15 cm) mit dem Laufmittel Butanol : Eisessig : Wasser 3 : 1 : 1

Substanz A = Boc - Gly

Substanz B = verestertes Boc - Gly

Der entstandene Ester konnte anhand des Massenspektrums nachgewiesen werden. (Abb.: 30)

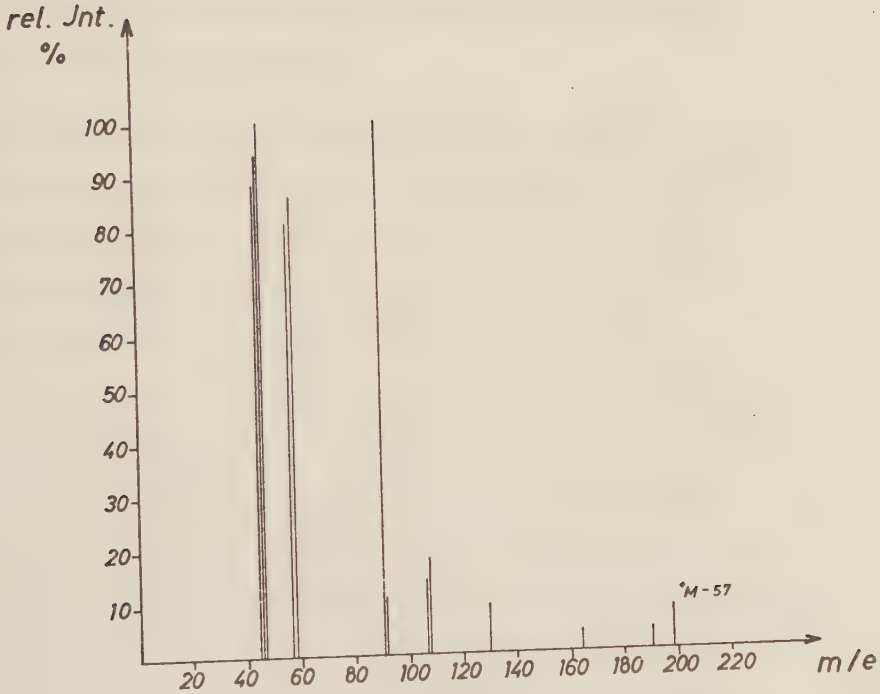


Abb.: 30

Massenspektrum verestertes Boc-glycin

Laut Wagenknecht kann die Ausbeute an verestertem Produkt noch erhöht werden, wenn zunächst die quartären Ammoniumsalze der Säure dargestellt werden und diese dann mit dem Alkylhalogenid zur Reaktion gebracht werden. Für TFA-Apomyoglobin empfiehlt es sich besonders, da die Carboxylgruppen, durch die Darstellungsmethode bedingt, vorwiegend als Natriumsalze vorliegen.

Das Überführen in das Ammoniumsalz gelang mittels des Ionenaustauschers Bio Rex 70, der mit Tetraäthylammoniumhydroxyd in die $N\equiv$ Form gebracht wurde. Dabei muß unbedingt darauf geachtet werden, daß der pH nicht über 9 steigt, da sonst die TFA-Gruppen abgespalten werden können.

Hat man nun das quartäre Ammoniumsalz des TFA-Apomyoglobins erhalten, so wird es in DMSO gelöst und mit einem 50 % Überschuß an Benzylchlorid versetzt. Das veresterte Produkt kann durch Fällen mit Wasser gewonnen werden, wobei die Ausbeute 60 % beträgt. Bei diesem Produkt kann zum Nachweis der Veresterung die enzymatische Verdauung mit Pepsin und Aminopeptidase M durchgeführt werden, da das veresterte Produkt einigermaßen in 2 % Essigsäure löslich war. Die Aminosäureanalyse zeigt eine durchschnittliche Veresterung von 70 %, wobei deutlich zu sehen ist, daß die Carboxylgruppen der Glutaminsäure reaktiver sind als die der Asparaginsäure. (Abb.: 31)

Aminosäure	theoretische Menge	erhaltene Menge	Veresterung %
Asparagin-säure	10	3,4	66,15
Glutamin-säure	19	4,75	75
Glycin	15	14,4	
Alanin	15	15,8	
Valin	8	7,6	
Isoleucin	9	10,1	
Leucin	17	16,68	
Phenylalanin	7	7,1	

Abb.: 31
Aminosäureanalyse vom veresterten TFA - Apo nach der Pepsin - Aminopeptidase Verdauung.

Die Reaktionszeit betrug bei diesem Versuch 24 Stunden; bei einer Verdopplung wird es sicher möglich sein, auch die restlichen freien Carboxylgruppen zu verestern.

2.2.2.2.3. Abspaltung des Benzylesters

Die Peptidchemie empfiehlt zur Abspaltung der Benzylgruppen zunächst einmal die katalytische Hydrierung. Es ist eine einfach durchzuführende Reaktion ohne apparativen Aufwand,

bei der unter Wasserstoffzufuhr das gelöste Protein in Anwesenheit von aktiviertem Palladium hydriert wird. Jedoch zeigte sich, daß Palladium die größte Menge an Protein adsorbiert, so daß die Ausbeute, trotz häufigen Waschens des Katalysators, maximal 30 % betrug. Da aber laut Strategieplan die Abspaltung der Benzylgruppen nicht der letzte Schritt ist, eignet sich die Hydrierung bei einem solchen Verlust an Protein in keiner Weise.

Bessere Ergebnisse lieferte die Abspaltung der Benzylgruppen mit Fluorwasserstoff, obgleich die experimentelle Durchführung durch das Einleiten, Verflüssigen und Entfernen von Fluorwasserstoff bedeutend schwieriger ist. Hier konnte eine Ausbeute von 85 % erreicht werden.

Aber wie bei allen Schutzgruppen ist nicht allein die Ausbeute an Produkt entscheidend, sondern auch die Abspaltungsrate, die wiederum aus der enzymatischen Verdauung mit Pepsin und Aminopeptidase gewonnen werden kann.

Aminosäure	theoretische Werte	erhaltene Werte	Abspaltungs-rate %
Asparagin-säure	10	7,3	73
Glutamin-säure	19	13,4	70,5
Glycin	15	12	
Alanin	15	11,7	
Valin	8	5,9	
Isoleucin	9	8,2	
Leucin	17	15,8	
Phenylalanin	7	6,1	

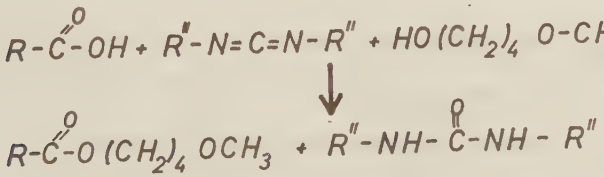
Abb.: 32
Aminosäureanalyse nach der Abspaltung der Benzylgruppen vom veresterten TFA-Apo mit HF.

Wie man aus der Tabelle (Abb.: 32) sieht, steigen im Vergleich zur Aminosäureanalyse veresterten Apomyoglobins die Werte von Asparagin- und Glutaminsäure wieder an. Auf den theoretischen Wert bezogen hat die Abspaltung der Estergruppen bei Asparaginsäure zu 73 % und bei Glutaminsäure zu 70,5 % stattgefunden. Da aber auch die Verhältniszahlen der anderen Aminosäuren zu niedrig liegen, ist in Wahrheit die Abspaltung vollständiger verlaufen als das obige Ergebnis angibt. Auch in dieses Produkt kann Hämin wieder eingelagert werden (s. 2.2.7.).

2.2.2.2.4. Einführung von Diäthylenglycolmonomethyläther als Carboxylschutzgruppe

Zwar ist mit der Einführung des Benzylesters nach Wagenknecht und seiner Abspaltbarkeit mit Fluorwasserstoff eine brauchbare Carboxylschutzgruppe gefunden worden, jedoch würde ein wasserlösliches, vollgeschütztes Protein die experimentelle Handhabung erheblich vereinfachen. Als lösliche Estergruppe sind vor allem Verbindungen des Äther- und Polyäthertyps denkbar. Da aber solche Carboxylschutzgruppen noch nie in der Peptidchemie verwendet wurden, gibt es keinerlei Anhaltspunkte über die Art ihrer Einführung und ihre Wirkung im Gesamtprotein.

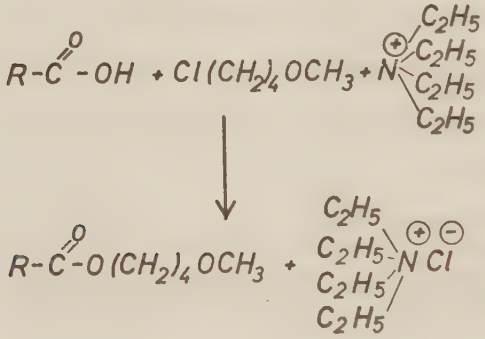
Eine Veresterung von TFA-Apomyoglobin mit Diäthylenglycolmonomethyläther soll über die Brauchbarkeit dieser Idee Auskunft geben.



Die Reaktion mit Diglyme wurde zunächst in Gegenwart von DCCI (NN'Dicyclohexylcarbodiimid) durchgeführt, das in einer Primärreaktion durch Anlagerung des Proteins die Carboxylgruppe aktivieren soll.

Obgleich DCCI bei Kupplungsreaktionen die besten Erfolge aufweisen kann, eignet es sich in diesem Fall nicht.

Da trotz langer Reaktionszeit die anschließend durchgeführte enzymatische Verdauung mit Pepsin und Aminopeptidase M eine Veresterung von nur 20 % zeigte, wurde als nächstes das chlorierte Diglyme als reaktivere Komponente zur Reaktion gebracht, analog der Wagenknechtschen Veresterungsmethode.



Das Ergebnis überraschte allerdings, da weder Wasser noch Eisessig noch Pyridin das isolierte Produkt zu lösen vermochte. Demnach müssen alle Seitengruppen einschließlich der OH-Gruppe von Tyrosin und Serin reagiert haben.

Wie aus den beiden Versuchen hervorgeht, ist es äußerst schwierig, geeignete Bedingungen für die Einführung einer neuen Schutzgruppe mit bestimmten Eigenschaften zu finden; es ist ein Forschungsgebiet für sich.

2.2.3. Darstellung und Isolierung geeigneter Fragmente

2.2.3.1. Spaltung mit Trypsin

Hat man nun für Myoglobin reversible Amino- und Carboxylschutzgruppen gefunden, so kann der erste Schritt der Semisynthese, die Darstellung und Isolierung geeigneter Fragmente, begonnen werden.

Als Ausgangsprodukt dient zunächst das TFA-Apomyoglobin, das durch die Blockierung sämtlicher Lysinreste im Molekül mit Trypsin nur noch an 2 Stellen, nämlich an den beiden Argininresten, gespalten wird. Um eine zusätzliche Hydrolyse zwischen den Carboxylgruppen von Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, bedingt durch die natürliche Verunreinigung mit Chymotrypsin, vorzubeugen, wird zu all diesen Versuchen Trypsin + TPCK, also Trypsin mit einem Chymotrypsinhemmer, verwendet. Nur so ist es möglich, die hohe Spezifität dieses Enzyms auszunützen und auf diese Weise 3 definierte Bruchstücke

TFA-T_1	1 - 31
TFA-T_2	32 - 139
TFA-T_3	140 - 153

bekannter Sequenz zu erhalten. (89) Die tryptische Verdauung wird bei pH 8.8 durchgeführt, und kann, da die freiwerdenden Carboxylgruppen den pH erniedrigen, am pH-Stat durch Titration mit Natronlauge verfolgt werden.

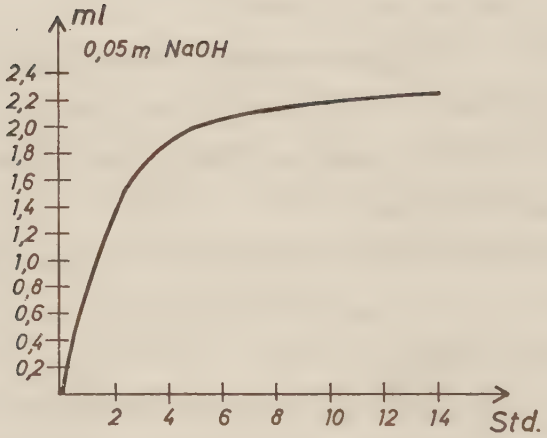


Abb.: 33

1g TFA-Apomyoglobin wird mit 2ml Trypsinlösung (10mg/ml) gespalten. Die frei werdenden COOH-Gruppen werden mit 0,05m NaOH am pH-Stat. titriert.

Wie man aus der Titrationskurve (Abb.: 33) entnehmen kann, ist nach etwa 14 Stunden die Reaktion beendet, jedoch wird eine quantitative Aussage über den Verlauf der Spaltung erst durch den Carboxypeptidasetest möglich. Ist die Spaltung vollständig, muß die Menge Arginin im Totalhydrolysat gleich der Menge Arginin sein, das durch die Carboxypeptidase-Verdauung freigelegt wird.

	Arginin theoretischer Wert	Arginin erhaltener Wert	Arginin [%]
Totalhydrolyse	2	1,8	100
Carboxypeptidase Verdauung	2	1,74	96,6

Abb.: 34

Carboxypeptidase - Test :
Die Aminosäureanalyse der Totalhydrolyse und Carboxypeptidase-Verdauung liefert Arginin - verhältniswerte, die miteinander verglichen werden.
Eingesetzte Menge: je 1 mg
Der erhaltene Argininwert der Totalhydrolyse wird gleich 100 % gesetzt.

Berücksichtigt man eventuelle Einwägefehler, so zeigt das Ergebnis dieses Versuchs, der in Abbildung 34 zusammengestellt ist, einen quantitativen Verlauf der Reaktion.

2.2.3.2. Isolierung der Spaltstücke

Die nächste Aufgabe ist nun, die erhaltenen Spaltstücke aus dem Gemisch als reine Komponenten zu isolieren. (90) Dazu wird die Mischung der Fragmente aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts getrennt. (91) Besonders bewährt hat sich die Kombination zweier Molekularsiebe, wobei die Spaltstücke zunächst an einer G-50 Sephadexsäule chromatographiert werden. (Abb.: 35) Dabei wird TFA-T_2 mit dem höchsten Molekulargewicht (13718) als

erstes eluiert, gefolgt von TFA-T_1 mit einem Molekulargewicht von 3321 und TFA-T_3 (1775). TFA-T_2 und TFA-T_1 lassen sich auf diese Weise zwar gut trennen, jedoch liegen die Bruchstücke TFA-T_1 und TFA-T_3, wie man am Elutionsdiagramm sieht, sehr dicht beieinander. Die folgende Chromatographie der einzelnen peaks an einer G-25 Sephadexsäule (Abb.: 36) dient zur weiteren Reinigung und Trennung, so daß am Ende dieser beiden Schritte die 3 Fragmente isoliert vorliegen (Abb.: 34), deren Reinheit mittels Aminosäureanalyse kontrolliert werden kann.

Vergleicht man die erhaltenen Werte mit denen der Theorie (Abb.: 38), so kann man eine hinreichende Übereinstimmung finden.

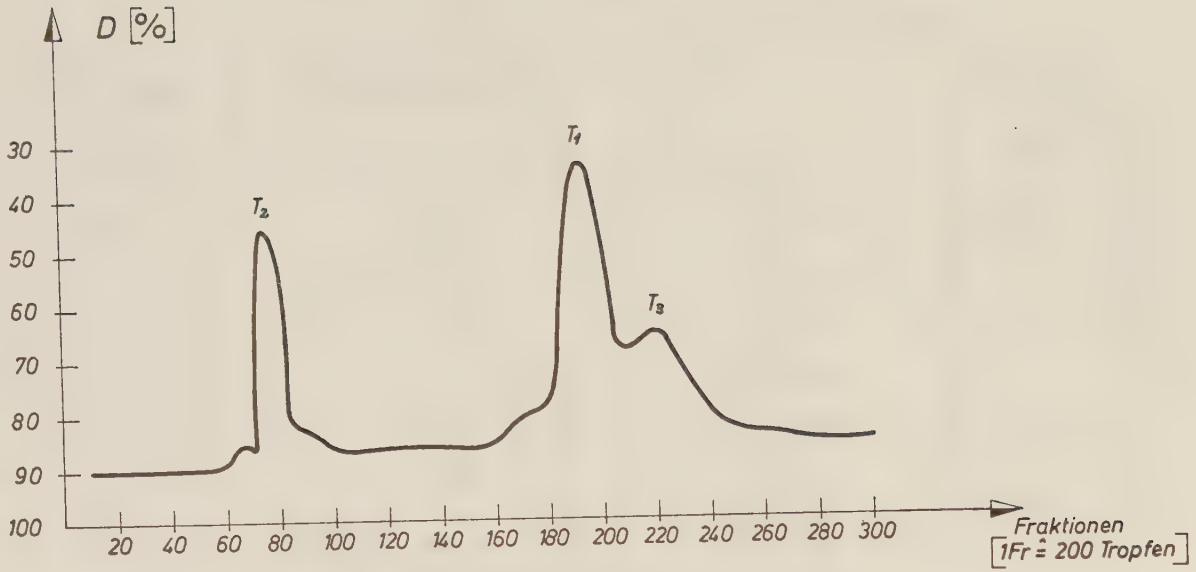


Abb.: 35 Elutionsdiagramm der Trypsinspaltstücke
T_2: Fraktion 70 - 82; T_1: Fraktion 178 - 204; T_3: Fraktion 206 - 260;
Die Chromatographie wurde an einer G_{50} - Sephadex - Säule (210 x 5cm)
durchgeführt und die Fragmente mit 0,05 m $NaHCO_3$ eluiert.

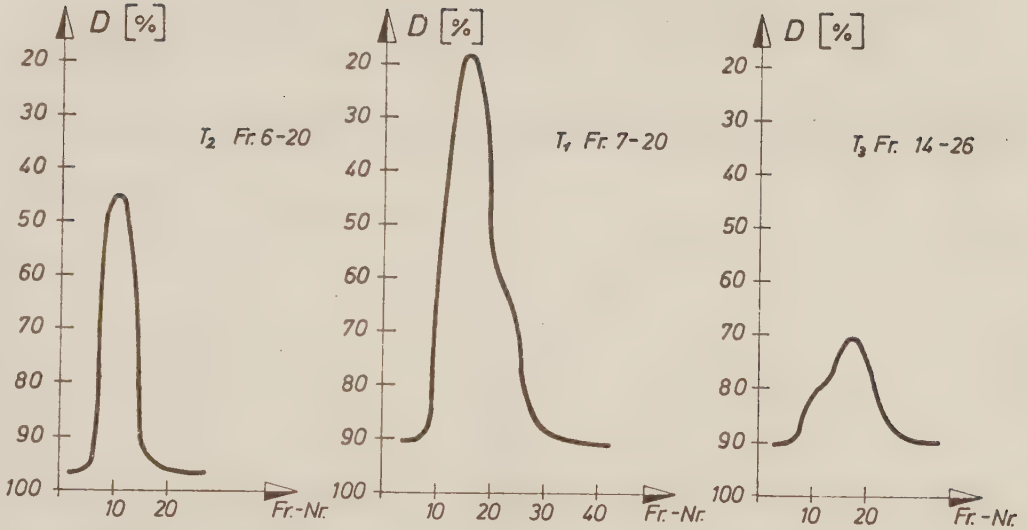


Abb.: 36 Elutionsdiagramme

Die Fragmente T_1, T_2, T_3 werden zur weiteren Reinigung an einer 6_{25} fine-Sephadex-Säule (180 x 3,5 cm) chromatographiert.
Das Elutionsmittel ist wiederum 0,05 m $NaHCO_3$.
1 Fraktion ≙ 200 Tropfen.

	eluierte ml	Gehalt an $NaHCO_3$ [mg]	Gesamtmenge [mg] nach der Lyophilisierung	Proteinmenge [mg]
T_1	169	71	192	121
T_2	182	76,5	555,5	479
T_3	208	86,4	158,4	72

Abb.: 37
Nach der Gefriertrocknung der einzelnen peaks wird der Proteingehalt von T_1, T_2, T_3 bestimmt.

	T_1		T_2		T_3	
	theoret. Wert	erhalt. Wert	theoret. Wert	erhalt. Wert	theoret. Wert	erhalt. Wert
Lysin	1	1,9	16	12,2	3	2,16
Histidin	1	1,0	10	4,1	0	
Arginin	1	0,7	1		0	
Asparagin S.	3	3,2	5	5,5	2	1,98
Threonin	0		7	6,8	0	
Serin	1	1,15	4	3,7	0	
Glutamin S.	6	5,7	11	11,2	2	2,2
Prolin	0	0,8	4	3,4	0	
Glycin	5	5,13	8	8	2	2,02
Alanin	2	2,56	11	11,1	2	1,98
Valin	5	4,9	3	3,3	0	
Methionin	0		2		0	
Isoleucin	2	2,38	6	6	1	0,965
Leucin	3	3,3	13	12,8	1	1,38
Tyrosin	0		1		1	
Phenylalanin	0		6	6,2	1	

Abb.: 38
Aminosäureanalyse der Fragmente nach der Reinigung an einer G_{25} fine Sephadex Säule.

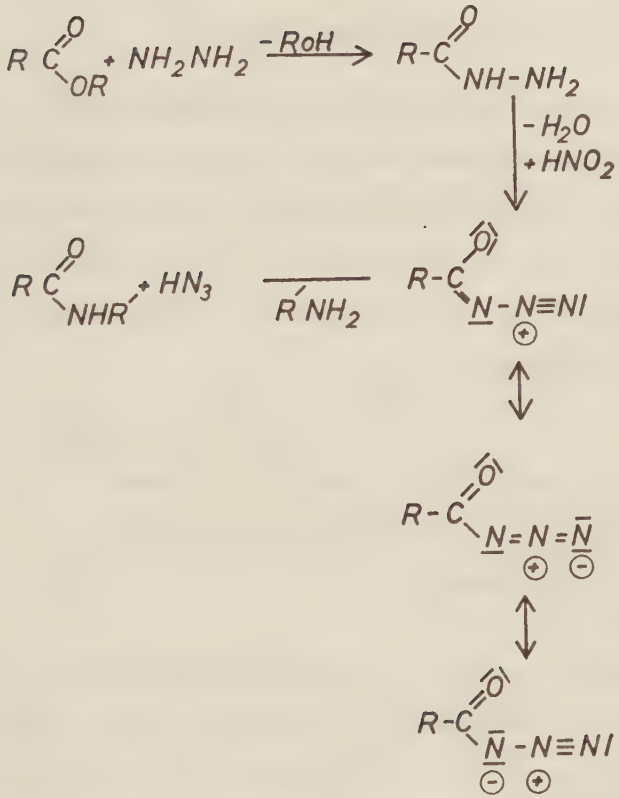
2.2.3.3. Spaltung mit Trypsin und N_2H_5OH

Die Darstellung und Isolierung der Fragmente ist nach der oben beschriebenen Methode zwar relativ einfach, jedoch bedarf es weiterer Umsetzungen, bevor diese Bruchstücke zur Kupplung eingesetzt werden können, nämlich die Blockierung sämtlicher freien Carboxylgruppen und die Aktivierung der zur Kupplung benötigten COOH-Gruppe.

Um diese beiden Wege einzusparen, wurde die Trypsinspaltung in Gegenwart von 2 m N_2H_5OH bei pH 8,5 vorgeschlagen.

Die Idee ist folgende:

Die durch die Spaltung freiwerdenden Carboxylgruppen bilden bei Anwesenheit von N_2H_5OH die jeweiligen Hydrazide. Durch Umsetzen mit $NaNO_2$ in Salzsäure können diese leicht in die Azide überführt werden, die sofort mit einer Aminokomponente, also einem zweiten Bruchstück, in Reaktion gebracht werden können.



Diese Azid-Kupplungsmethode (92) wurde 1902 von Curtis eingeführt und ist heute noch eine leistungsfähige, racemisierungssichere Kupplungsmethode, vor allem, da die freigesetzte Stickstoffwasserstoffsäure gasförmig aus dem Reaktionsgemisch entweicht.

Eine gezielte Kupplung ist somit möglich, ohne die Carboxylgruppen der Glutaminsäure und Asparaginsäure durch Benzylester zu blockieren. Sie liegen bedingt durch die Elution mit $NaHCO_3$ als Na-Salze vor und diese Salzbildung reicht aus,

um sie vor einer Hydrazinolyse zu schützen.

Die experimentelle Durchführung dieser Idee wurde sowohl am TFA-Apomyoglobin als auch am Citraconyl-Apomyoglobin versucht. In beiden Fällen konnte die Spaltung am schreibenden Titrator verfolgt werden. (Abb.: 39,40) Sie verlief allerdings äußerst langsam und war erst nach etwa 30 Stunden beendet.

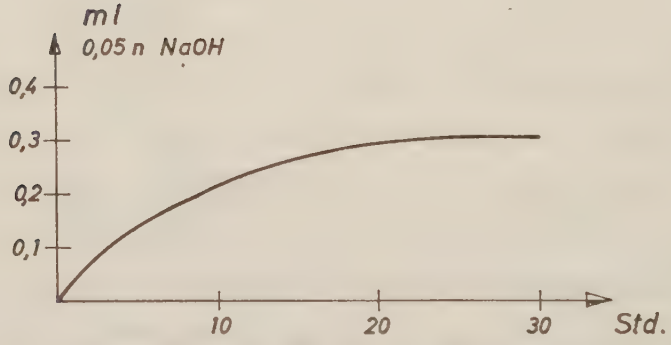


Abb.: 39 Spaltung von 200 mg TFA-Apomyoglobin mit 0,5 ml Trypsinlösung (10 mg/ml) in Gegenwart von 2m N_2H_5OH.

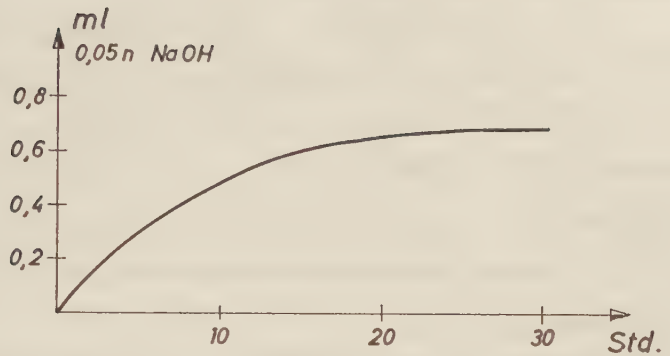


Abb.: 40

Spaltung von 500mg Citraconyl - Apomyoglobin mit 1ml Trypsinlösung (10mg/ml) in Gegenwart von 2m N_2H_5OH.

Die Spaltungsrate, die ja aus dem Carboxypeptidasetest ermittelt wird, betrug beim TFA-Apomyoglobin 70 %, beim Citraconyl-Apomyoglobin 65 %. (Abb.: 41) Da aber das Enzym nur freies Arginin abzuspalten vermag, bedeutet dies, daß bei den TFA-Bruchstücken maximal 30 %, bei den Citraconyl-Bruchstücken maximal 35 % als gewünschte Hydrazide vorliegen.

	TFA-Apo			Citraconyl-Apo		
	Arginin theor. Wert	Arginin erh. Wert	Arginin %	Arginin theor. Wert	Arginin erh. Wert	Arginin %
Totalhydrolyse	2	1,94	100	2	1,86	100
Carboxypeptidase Verdauung	2	1,36	70	2	1,21	65

Abb.: 41

Carboxypeptidase - Test:

Die Aminosäureanalyse der Totalhydrolyse und der Carboxypeptidase - Verdauung liefern Arginin - Verhältniswerte, die miteinander verglichen werden.

Eingesetzte Menge: je 1 mg

Der erhaltene Argininwert der Totalhydrolyse wird gleich 100 % gesetzt.

2.2.3.4. Isolierung der Spaltstücke

Die Abtrennung und Auftrennung der Hydrazid-Fragmente erwies sich als eine nicht zu bewältigende Schwierigkeit. Schickt man das Gemisch wie üblich über G-50, G-25 Sephadexsäulen, so erhält man keinerlei Auftrennung, nur eine Vielzahl sich überlappender peaks, deren Charakterisierung mittels Aminosäureanalyse auch nach mehrmaliger Chromatographie nicht möglich war. (Abb.: 42,43)

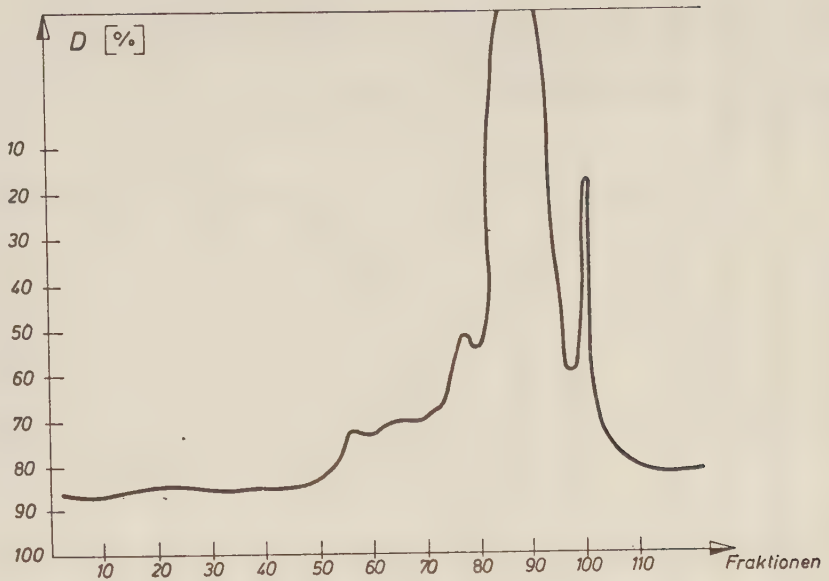


Abb.: 42 Elutionsdiagramm von 200 mg TFA-Apo, das in Gegenwart von 2m N_2H_5OH mit Trypsin gespalten wurde. Die Chromatographie erfolgte an einer G_{25} - Sephadex-Säule (180 x 3,5 cm). Das Elutionsmittel war 0,05 m $NaHCO_3$
1 Fraktion = 200 Tropfen

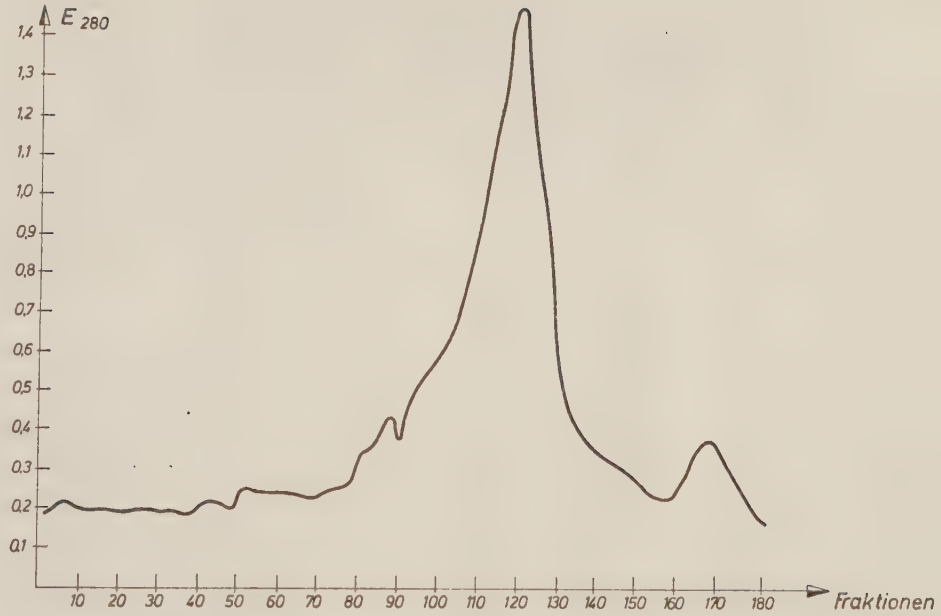


Abb. 43 Elutionsdiagramm von 500 mg Citraconyl-Apo, das in Gegenwart von 2m N_2H_5OH mit Trypsin gespalten wurde. Die Chromatographie erfolgte an einer G_{50}-Sephadex-Säule (210x5cm) Das Elutionsmittel war 0,05m $NaHCO_3$
1 Fraktion = 200 Tropfen. E_{280} wurde in einer 1cm Küvette gemessen.

2.2.4. Veresterung der Fragmente

2.2.4.1. Veresterung von TFA-T_2 mit Phenyldiazomethan

Die Verwendung von Fragmenthydraziden, eine einfache elegante Methode zur Azidkupplungsreaktion, scheiterte an der Isolierung dieser Peptidderivate und damit wird eine Veresterung der Bruchstücke vor der Kupplung zur Notwendigkeit.

Wie bereits ausführlich erläutert, erzielt dabei die Benzylierung der Carboxylgruppen sowohl mit Phenyldiazomethan als auch mit Benzylchlorid die besten Ergebnisse. Ihrer vielen Vorteile wegen wird für die weitere Arbeit ausschließlich die Wagenknecht'sche Methode verwendet, jedoch soll hier ein kurzer Versuch die Brauchbarkeit von Phenyldiazomethan auch bei der Fragmentveresterung zeigen.

Die Benzylierung von TFA-T_2 nach der allgemeinen Vorschrift durchgeführt dient hier als Beispiel. Aus Mangel an brauchbaren Möglichkeiten, die Veresterung der 16 Carboxylgruppen von T_2 nachzuweisen, nimmt man stellvertretend für alle das Maß der Veresterung von Arginin, der carboxylendständigen Aminosäure des Fragments. Hier kann die Veresterungsrate leicht enzymatisch festgestellt werden. Wäre Arginin nicht verestert, so müßte die Aminosäureanalyse nach der Carboxypeptidasebehandlung ähnliche Werte

wie die der Totalhydrolyse zeigen. Bei der Veresterung von Arginin dagegen strebt dieser Aminosäurewert gegen O, da die Carboxypeptidase nur ungeschütztes Arginin abspaltet. Ist aber Arginin verestert, so ist auch die Wahrscheinlichkeit groß, daß auch die COOH-Gruppen von Glutamin- und Asparaginsäure benzyliert wurden.

Die Ergebnisse des Versuchs zeigen in Abbildung 44 einen guten Verlauf der Veresterung. Außerdem sieht man in der Trypsin-Carboxypeptidasebehandlung die Möglichkeit einer enzymatischen Abspaltung des Esters von Arginin. Der Argininwert erreicht fast den der Totalhydrolyse, obgleich alle Reaktionen in 50 % Pyridin durchgeführt werden mußten.

	T_2 Arginin
Totalhydrolyse	1
Carboxypeptidase Verdauung	0,13
Trypsin. u. Carboxyp. Verdauung	0,85

Abb.: 44

Enzymatischer Nachweis der Veresterung mit Phenyldiazomethan an Hand der Arginin Veresterung.

2.2.4.2. Veresterung von TFA-T_1 und TFA-T_2 mit Benzylchlorid

Um eine vernünftige Kupplungsreaktion durchführen zu können, werden ausreichende Mengen von TFA-T_1 (200 mg), TFA-T_2 (200 mg) mit Benzylchlorid und Tetraäthylammoniumhydroxid verestert. Dazu müssen die beiden Fragmente, die als Natriumsalze vorliegen und so nicht in DMSO löslich sind, mittels des Ionenaustauschers Bio Rex 70 von der Na-Form in die $N\overset{\diagup}{\underset{\diagdown}{=}}$ Form überführt werden. Erst dann ist eine Veresterung mit Benzylchlorid in DMSO möglich. (Abb.: 45) Nach einer experimentell ermittelten Reaktionszeit von 2 Tagen, die notwendig ist für eine gute Veresterung, kann das Reaktionsprodukt durch Fällen mit Wasser gewonnen werden, wobei die relativ schlechten Ausbeuten

TFA-T_1 = 62 %

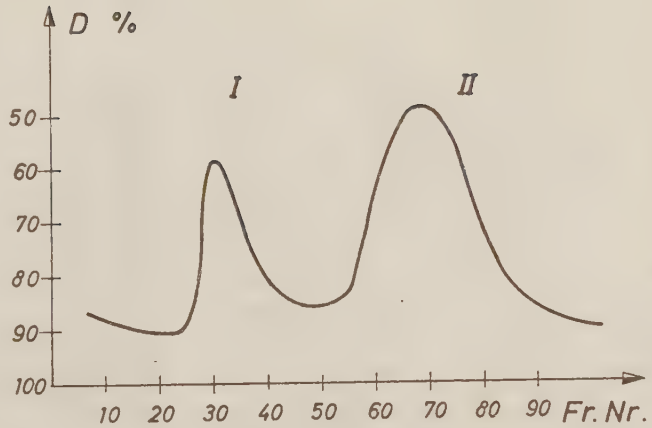
TFA-T_2 = 59 %

einerseits durch die Adsorption des Proteins an den Ionenaustauscher, andererseits durch die unvollständige Fällung mit Wasser bedingt sind.

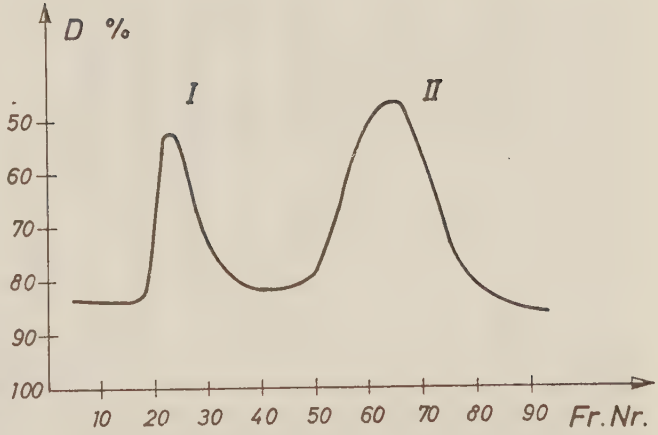
	T_1 Arginin	T_2 Arginin
Totalhydrolyse	1	1
Carboxypeptidase Verdauung	0,15	0,1

Abb.: 45

Enzymatischer Nachweis der Veresterung von T_1 und T_2 mit Benzylchlorid / $N\overset{\diagup}{\underset{\diagdown}{=}}$ an Hand der Argininveresterung.



Peak I: verestertes T_2
Peak II: Benzylchlorid



Peak I: verestertes T_1
Peak II: Benzylchlorid

Abb.: 46

Elutionsdiagramme: verestertes T_1 und T_2 werden an einer LH_{20}-Sephadex-Säule (100x3 cm) chromatographiert.

Elutionsmittel: DMSO

Auch ein Versuch, die veresterten Produkte an einer LH-20 Sephadexsäule zu isolieren, brachte keine weitere wesentliche Verbesserung der Ergebnisse. Das zusätzliche Problem hierbei war die Entfernung von DMSO unter schonenden Bedingungen. (Abb.: 46)

2.2.5. Kupplung von TFA-T_1 und TFA-T_2

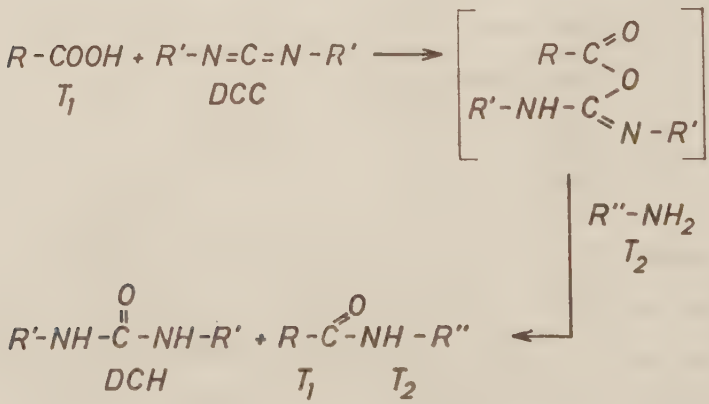
Gegenwärtig sind etwa 50 verschiedene Kupplungsmethoden bekannt, aber nur wenig Synthesevarianten haben sich, wie aus statistischen Auswertungen hervorgeht, für die Kupplung größerer Peptide als leistungsfähig erwiesen, wobei die

Azid-
Anhydrid-
p-Nitrophenylester-
DCC-
DCC/HO Suc-

Methode die bekanntesten unter ihnen sind. Obgleich bei der Azidmethode kein spezieller Schutz der Carboxylseitengruppen nötig ist und auch noch keine Racemisierung beobachtet wurde, vermindert die Vielzahl der möglichen Nebenreaktionen, wie Amidbildung, Curtiusabbau zu Isocyanat, Harnstoff, Urethan usw., deren Abtrennung oft nur äußerst schwer gelingt, den methodischen Wert dieses Kupplungsverfahrens. (93,94,95,96,97)

Die übrigen oben angeführten Methoden werden inzwischen immer häufiger benutzt, vor allem ist bei der jetzt racemisierungssicheren Anhydrid-Methode und dem DDC/Kombinationsverfahren eine verstärkte Anwendung zu verzeichnen.

Die Fragmentkondensation von TFA-T_1 und TFA-T_2 wird nach der von Wünsch-Weygand zum ersten Mal verwendeten Methode mit DCC/HO-Suc (NN'Dicyclohexylcarbodiimid/N-Hydroxysuccinimid) durchgeführt. Dabei verläuft der erste Schritt der Reaktion über eine Addition der Carboxylgruppe an das Diimid zu einem O-Acyllactim, das mit der Aminokomponente unter Abspaltung von NN'Dicyclohexylharnstoff (DCH) direkt das Peptidderivat bildet.



Um die Racemisierungsrate möglichst kleiner als 1 % zu halten, werden der Reaktionsmischung 2 Äquivalente N-Hydroxysuccinimid zugesetzt.

Bei TFA-T_1, das ja die COOH-Komponente bei der Kupplung darstellt, muß zunächst der Benzylester vom Arginin, der Endaminosäure , abgespalten werden und zwar gelingt es vollständig mit Trypsin in 50 % Pyridin, ohne die COOH-Schutzgruppen der Glutamin- und Asparaginsäure abzuspalten.

	T_1 Arginin
Totalhydrolyse	1
Carboxypeptidase Verdauung	0,15
Trypsin + Carboxypeptidase Verdauung	0,97

Erst dann können die Komponenten zur Reaktion gebracht werden. Die lange Reaktionszeit von 3 Tagen ist notwendig, da DMF als Lösungsmittel dient und die DCC-Kupplungen in diesem Reagenz sehr langsam ablaufen. DMSO als gutes Lösungsmittel der veresterten Fragmente kann wegen der möglichen Nebenreaktionen hierbei nicht verwendet werden. (98) Außerdem besitzt DMF einen weiteren Vorteil. Das gekuppelte Rohprodukt kann bei Verwendung dieses Lösungsmittels leicht mit Äther gefällt und isoliert werden.

zur Kupplung eingesetzte Menge T_1 [mg]	8,2
zur Kupplung eingesetzte Menge T_2 [mg]	34
Proteinmenge nach der Ätherfällung [mg]	32
Verlust an Protein [%]	24

Eine erste Aussage über den Verlauf der Reaktion ist wiederum möglich durch den Carboxypeptidase-Test, dessen Ergebnisse die gelungene Kupplung bestätigen.

	Arginin
Totalhydrolyse von T_1 vor der Kupplung	1
Carboxypeptidase-Test von (T_1 + T_2) nach der Kupplung	0,185

Die Aminosäureanalyse nach der Enzymbehandlung zeigt nahezu kein Arg, da das TFA-T_1-Arginin reagiert hat und das TFA-T_2-Arginin ja verestert ist.

Allerdings sind die Ergebnisse noch mit Vorbehalt zu betrachten, denn das Protein löste sich nach der Kupplung äußerst schlecht in 50 % Pyridin und es könnte durchaus sein, daß die Carboxypeptidase-Verdauung nicht vollständig war. Auf dieser Stufe jedoch kann kein anderer Beweis herangezogen werden.

2.2.6. Abspaltung der Schutzgruppen und Isolierung des gekuppelten Produkts

2.2.6.1. Abspaltung der Benzylgruppen und Isolierung des gekuppelten Produkts

Um Resyntheseversuche machen zu können, müssen neben der Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen vom Protein die gekuppelten Fragmente von Ausgangs- und Nebenprodukten gereinigt werden, was am besten nach der Abspaltung der Benzylgruppen mit Fluorwasserstoff erfolgen kann, da das TFA-Protein in Wasser löslich ist und noch keine Aggregationsneigung zeigt.

Das Problem dabei ist jedoch die Trennung von TFA-T_2 (Ausgangsprodukt MG: 13713) und TFA-T_1—T_2 (Gekuppeltes Produkt MG: 17039). Sie haben ähnliche Molekulargewichte und müssen, da nur geringe Mengen zur Verfügung stehen, an einer kleinen G-50 Sephadexsäule getrennt werden.

Ein Testlauf von

1.) TFA-Apomyoglobin mit MG: 18814,
stellvertretend für TFA-T_1—T_2
2.) TFA-T_2
3.) TFA-Apomyoglobin + TFA-T_2

soll über die ungefähre Lage der zu erwartenden peaks und ihre Trennmöglichkeiten Auskunft geben.

Betrachtet man die Elutionsdiagramme (Abb.: 47), so sieht man, daß TFA-T_2 und TFA-Apomyoglobin, wenn sie getrennt über die Säule geschickt werden, an der gleichen Stelle ihre Elutionspeaks haben. Beschickt man die Säule jedoch mit einer Mischung der beiden Substanzen, so erhält man eine Trennung. Die Identität von peak II mit T_2 konnte eindeutig mittels Aminosäureanalyse bestätigt werden. (Abb.: 48)

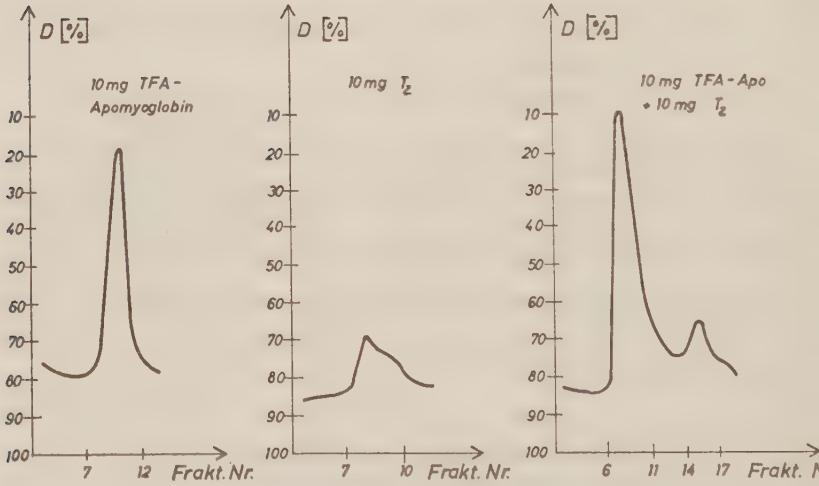


Abb.: 47 Elutionsdiagramme

Säule: G_{50} fine Sephadex (50 x 1,5 cm)
Elutionsmittel: 0,05 m $NaHCO_3$

	erhaltene Werte	theoretische Werte
Lysin	10,97	16
Histidin	5,94	10
Asparagin S.	6,1	5
Glutamin S.	12,4	11
Glycin	9	8
Alanin	10,45	11
Valin	3,94	3
Isoleucin	5,7	6
Leucin	11,5	13
Phenylalanin	4,66	6

Abb.: 48

Aminosäureanalyse vom peak II nach der Chromatographie des TFA, T_2 Gemisches.

Auf diese Weise muß es also möglich sein, das gekuppelte Produkt frei von Ausgangsmaterial zu erhalten.

Da die HF-Abspaltung einen weiteren Verlust an Protein mit sich brachte, standen zur Chromatographie nur noch 25,5 mg zur Verfügung. Angenommen, die Kupplung ist

nicht vollständig, verlaufen, so kommt man etwa in die Größenordnung der zum Testlauf verwendeten Substanzen und ein Vergleich der Ergebnisse sollte damit gegeben sein.

Das Elutionsdiagramm zeigt deutlich 3 peaks. (Abb.: 49)

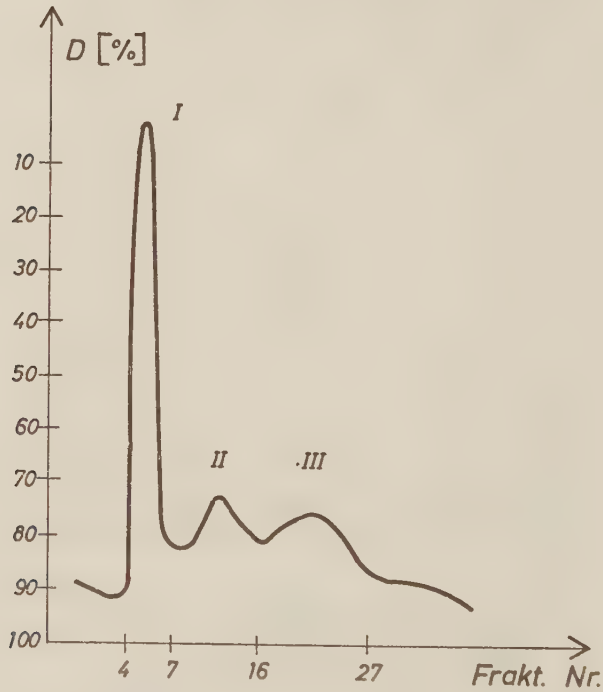


Abb. 49 Elutionsdiagramm

(T_1-T_2) gekuppelt, werden an einer G_{50}-fine Sephadex-Säule (5x 15 c m) chromatographiert.
Proteinmenge: 25,5 mg
Elutionsmittel: 0,05 m $NaHCO_3$

Peak 1 ist auf jeden Fall diejenige Substanz mit dem höchsten Molekulargewicht. Hat die Kupplung stattgefunden, so wird es TFA-T_1—T_2-gekuppelt sein, ist die Reaktion dagegen negativ verlaufen, so wird nur TFA-T_2 dafür in Frage kommen.

Da aber TFA-T_1 durch den tryptophanhaltigen Rest die stärker absorbierende Substanz ist, kann niemals TFA-T_2 allein peak I verkörpern und bei einer Mischung von gekuppeltem Produkt und TFA-T_2 muß ja eine Trennung wie im Testlauf erfolgen. Auch die Aminosäureanalyse von peak I (Abb.: 50) zeigt eine Übereinstimmung mit den theoretischen TFA-T_1—T_2-gekuppelt Werten, die besonders bei Valin und dem Glutamin/Alanin-Verhältnis zum Ausdruck kommt.
Auch peak II und III (Abb.: 51) konnten mit Hilfe der Aminosäureanalyse als die Ausgangssubstanzen T_2 und T_1 identifiziert werden. Wichtig für die weitere Arbeit ist nur das gekuppelte Produkt, von dem 15 mg isoliert werden konnten.

	wäre peak I (T_1 - T_2) gekuppelt		wäre peak I T_2	
	erhalt. Werte	theoret. Werte	erhalt. Werte	theoret. Werte
Asparagin S.	14,4	8	10,7	5
Threonin	7,5	7	5,7	7
Serin	6,05	5	4,55	4
Glutamin S.	17,4	17	13,1	11
Alanin	12,7	13	9,55	11
Valin	8,82	8	6,64	3
Isoleucin	8,5	8	6,4	6
Leucin	14,3	16	10,75	13
Phenylalanin	6,8	6	5,05	6

Abb.: 50

Aminosäureanalyse von peak I nach der Chromatographie von (T_1 - T_2) gekuppelt an einer G_{50} fine Sephadex-Säule (5x1,5 cm)

	wäre peak II T_2		wäre peak III T_1	
	erhalt. Werte	theoret. Werte	erhalt. Werte	theoret. Werte
Asparagin S.	7,34	5	5,5	3
Glutamin S.	14,13	11	5,7	6
Glycin	10,1	8	4,3	5
Alanin	10,4	11	4,0	2
Valin	4,5	3	3,7	5
Isoleucin	5,09	6	1,56	2
Leucin	10,19	13	1,99	3
Phenylalanin	3,069	6	1,17	—

Abb.: 51

Aminosäureanalysen von peak II und III nach der Chromatographie von (T_1-T_2) an einer G_{50} fine Sephadex - Säule.

2.2.6.2. Abspaltung der TFA-Gruppe

Nach der Abspaltung der TFA-Gruppen mit 1 m Piperidin in Gegenwart von Harnstoff folgt nicht wie üblicherweise die Reinigung an einer G-25 grob, sondern, um einer allzu großen Verdünnung vorzubeugen, eine intensive Dialyse gegen 0,08 m Borat. Das "nackte" Produkt kann nämlich nicht mehr lyophylisiert werden, es aggregiert und wird unlöslich dabei. Auch eine Ultrafiltrationseinengung brächte zu große

Verluste, da in Anwesenheit von 8 m Harnstoff die Ultrafiltrationsmembranen ihre Selektivität verlieren und damit auch für das Protein durchlässig werden können.

2.2.7. Einlagerung von Hämin

2.2.7.1. CD-Messungen

Mit der erfolgreichen Kupplung der Fragmente T_1, T_2 und der Isolierung des Produkts durch die Abtrennung der Ausgangssubstanzen konnten zwar alle chemischen Schwierigkeiten des Unternehmens überwunden werden, jedoch steht das Interessanteste und Wichtigste, die Prüfung auf natives, rekombinierfähiges Protein, das auf chemischem Weg erhalten wurde, noch aus.

Verantwortlich für die biologische Aktivität ist die Primärstruktur (99,100,101), die die intramolekularen Wechselwirkungen ermöglicht und damit die Konformation bestimmt. Die Faltung der Proteinkette gewährleistet wiederum die 1 : 1 Komplexbildung mit Hämin und die Stabilität des gesamten Moleküls. (102) Sie ermöglicht erst den Schutz des Fe^{2+} vor der Oxidation und garantiert die reversible Bindung von Sauerstoff.

Mit der Entwicklung des Circular-Dichroismus konnte also die Konformation, bei Myoglobin der hohe Helixgehalt, als

wesentliches Kriterium nativen Globins herangezogen werden, da α-Helix, ß-Struktur und random coil 3 charakteristische Kurven im CD geben. (103,104,105) Durch Vergleich der maximalen Elliptizität von Myoglobin und der voll helicalen Poly-α-Glutaminsäure, deren random coil-Form bei 223 nm kein CD zeigt, kann der Helixgehalt bestimmt werden.

Damit kann aber auch jede Veränderung der Molekülstruktur wie zum Beispiel in Gegenwart von Harnstoff (106,107), die vorzugsweise einer Sprengung der H-Brücken innerhalb der Polypeptidkette zuzuordnen ist, genau erfaßt werden. Die Denaturierung kommt also einem Übergang in die energieärmere Form gleich und ist mit einem Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur verbunden. Als Maß für diese Konformationsänderung dient die Änderung der α-helicalen Struktur, gemessen im CD. (108 - 117)
Auch zwischen Myoglobin und nativem Apomyoglobin bestehen noch geringe Konformationsänderungen, die auch im Unterschied der Seitenkettenreaktivität (Imidazol-Tyrosinreste), im Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten zum Ausdruck kommen. (118 - 123)

Wie die CD-Messungen zeigen, sind im Myoglobin 15 Reste mehr in helicalen Bereichen als im Globin, was hauptsächlich durch die Wechselwirkungen zwischen Globin und dem Porphyrinring und nicht durch die Globin-Eisen-Beziehung hervorgerufen wird. Durch Zugabe von Porphyrin kann nämlich

der selbe Helixgehalt wie bei der Rekombination mit Hämin erreicht werden. (124 - 130)

Um über die Rekombinierfähigkeit von gekuppeltem T_1 und T_2 hinreichende Aussagen machen zu können, muß zunächst der Einfluß chemischer Behandlung während des Syntheseweges auf die Konformation festgestellt werden. Dabei dient der θ-Wert (225 mu von nativem Apomyoglobin und rekombiniertem Apomyoglobin als Standardwert. (131,132)

Natürlich kann man nicht erwarten, daß der Helixgehalt, gemessen im CD, 75 % beträgt. Dieser Wert stammt von Einkristall-Röntgenstruktur-Untersuchungen und er wird beim Lösen des Kristalls auf ungefähr 60 % erniedrigt. (133) Die Verminderung des Helixgehaltes wurde bei vielen Proteinen beobachtet, jedoch ist sie unabhängig von der jeweiligen Länge der helicalen Bereiche, die bei Myoglobin ja verhältnismäßig kurz sind.

In wie weit die Syntheseschritte Trifluoracetylierung, Benzylierung, Kupplung, Abspaltung der Schutzgruppen mit Piperidin und HF die Konformation verändern, zeigen die folgenden CD-Spektren. (Abb.: 52 - 54) (134 - 137) Bestimmt wird immer der θ-Wert 225 mu vor und nach der Einlagerung von Hämin und er wird verglichen mit dem der Poly-α-Glutaminsäure, als voll helicaler Substanz. Über die maximale Elliptizität der Poly-α-Glutaminsäure findet man in der Li-

teratur verschiedene Angaben, die vor allem von der unterschiedlichen Proteinkonzentrationsbestimmung herrühren. Für unsere Berechnungen wurde der Θ-Wert 31000 zugrundegelegt.

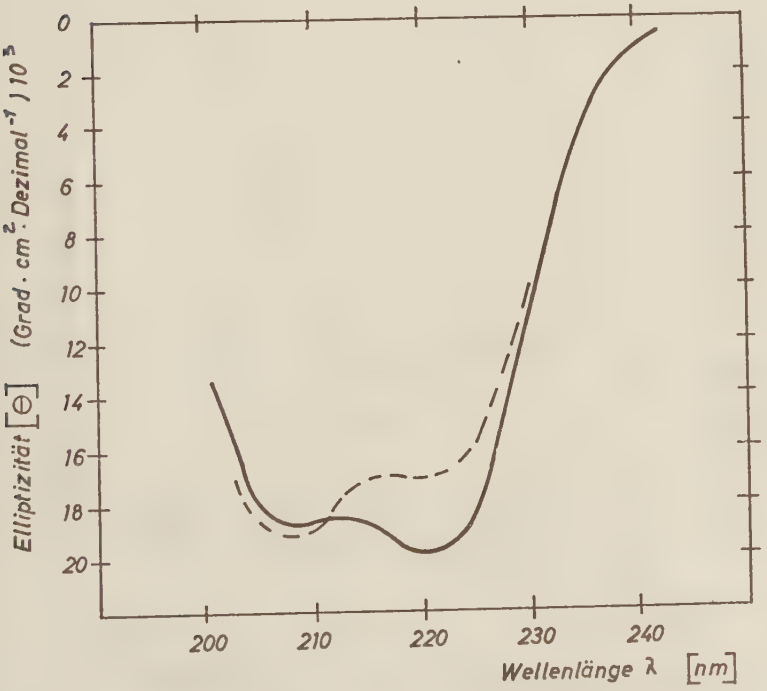


Abb.: 52

CD - Spektren

—— Apomyoglobin + Hämin

– – – Apomyoglobin

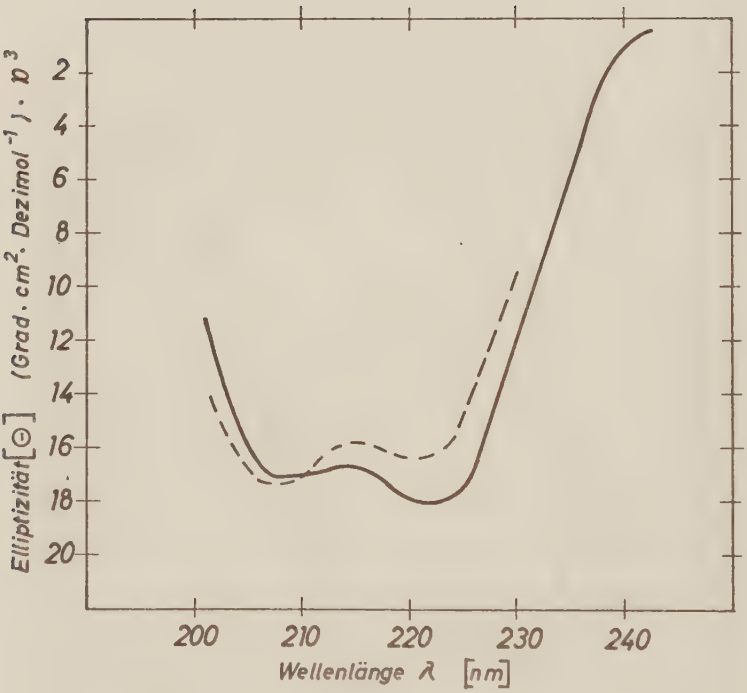


Abb.: 53

CD-Spektren

—— TFA-Apomyoglobin + Hämin
– – – TFA-Apomyoglobin

} nach Entfernen der Schutzgruppen

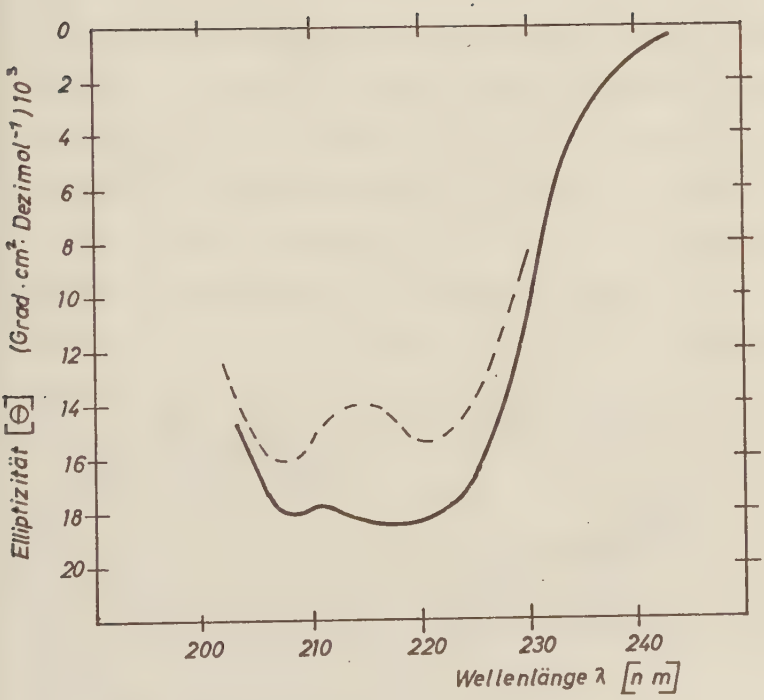


Abb.: 54

CD - Spektren

—— TFA - Benzyl. Apomyoglobin + Hämin } nach Entfernen der Schutzgruppen

– – – TFA - Benzyl. Apomyoglobin

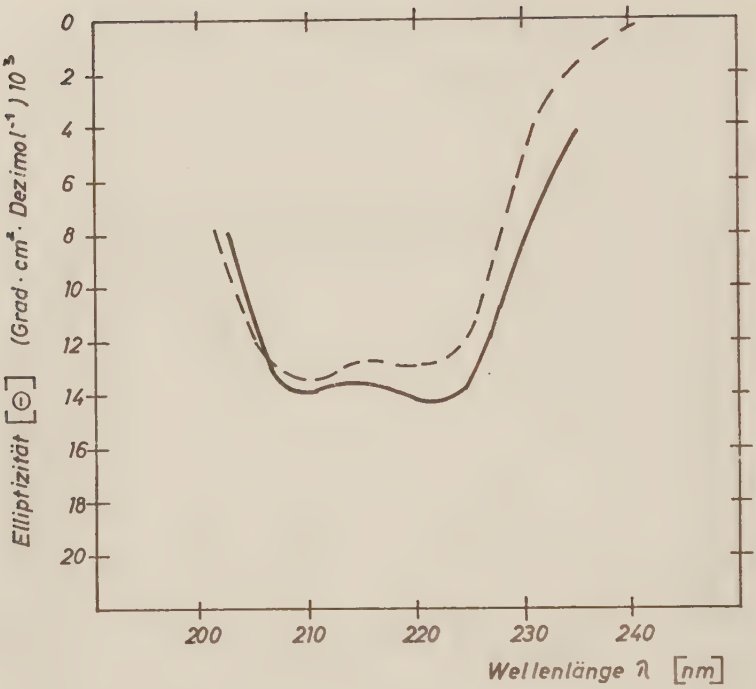


Abb.: 55

CD - Spektren

—— (T_1 - T_2) gekuppelt + Hämin

--- (T_1 - T_2) gekuppelt

	ohne Hämin		rekombiniert mit Hamin	
	⊖ 225	% Helix	⊖ 225	% Helix
Apomyoglobin	15600	50,4	17980	58
TFA - Apo	14840	49,2	17400	56,2
TFA - Benzyl. Apo	13900	45	16620	53,7
(T_1 + T_2) - gekuppelt	11 750	37,9	13450	43,4

Aus den Tabellenwerten sieht man zunächst, daß jede chemische Behandlung einen Teil des Proteins irreversibel denaturiert. So ist nach der Abspaltung der Aminoschutzgruppen eine Erniedrigung des Helixgehaltes um 2 % und nach der Freilegung des vollgeschützten Proteins um 6 % zu verzeichnen. Der Verlust ist jedoch erstaunlich gering, stimmt jedoch völlig mit den Arbeiten über reversible Denaturierung überein, die ebenfalls bei ähnlichen Behandlungen natives Protein zu 90 % wieder erhalten konnten. Die θ-Werte 225 mμ der rekombinierten Proteine zeigen deutlich an der Vertiefung, daß alle diese Produkte in der Lage sind, Hämin zu binden.

Selbst die gekuppelten, aus dem Gesamtverband herausgelösten Fragmente T_1 und T_2 weisen noch einen hohen Helixgehalt auf (Abb.: 55), der zwar nicht dem theoretischen Wert von 94 % entspricht, jedoch 81 % erreicht, wenn man vom TFA-Benzyl-Proteinwert ausgeht. Auch diese gekuppelten Bruchstücke können Hämin einlagern.

2.2.7.2. Titrationskurven

Da die richtige Einlagerung von Hämin ein untrügliches Zeichen nativen Globins ist, kann erst die Wiederherstellung der biologischen Aktivität beim semisynthetisierten Produkt die Brauchbarkeit der Methode erweisen.

Schon sehr bald wurde festgestellt, daß die Einlagerung von Hämin eine Änderung im Absorptionsspektrum zur Folge hat, die vor allem bei 410 nm deutlich wird. (138 - 140) Dort treten die für sämtliche Metallporphyrine typischen Soretbanden auf. Bei stufenweiser Zugabe von Hämin zu Apomyoglobin steigt die Absorption bei 410 nm so lange an, bis der Häm/Apoprotein-Komplex gebildet ist. Erst dann bleibt sie konstant und entspricht der Eigenabsorptionszunahme weiter hinzugefügten Hämins, wobei eine chemische Vorbehandlung wie TFA, HF eine reversible Denaturierung zu sein scheint und nur geringen Einfluß auf die Einlagerungsfähigkeit hat. (Abb.: 56) Da Myoglobin nur eine Hämgruppe pro Molekül hat, müßte also Apomyoglobin mit Hämin einen 1 : 1 Komplex bilden. Aus den Knickpunkten in den erhaltenen Titrationskurven läßt sich jedoch nur ableiten, daß auch TFA-Benzyl-Apomyoglobin, sowie gekuppeltes-(T_1+T_2) nach der Abspaltung ihrer Schutzgruppen in der Lage sind, Hämin komplexisch annähernd 1 : 1 zu binden, wobei aber keinerlei Aussagen über die Art der Liganden an der 5. und 6. Koordinationsstelle des Eisens gemacht werden können, die ja so entscheidend sind für die Funktionsfähigkeit des Myoglobins. Wäre Apomyoglobin irreversibel denaturiert, so würde die Soretbande wesentlich niedriger sein und der Absorption von freiem Hämatin gleichkommen. (141)

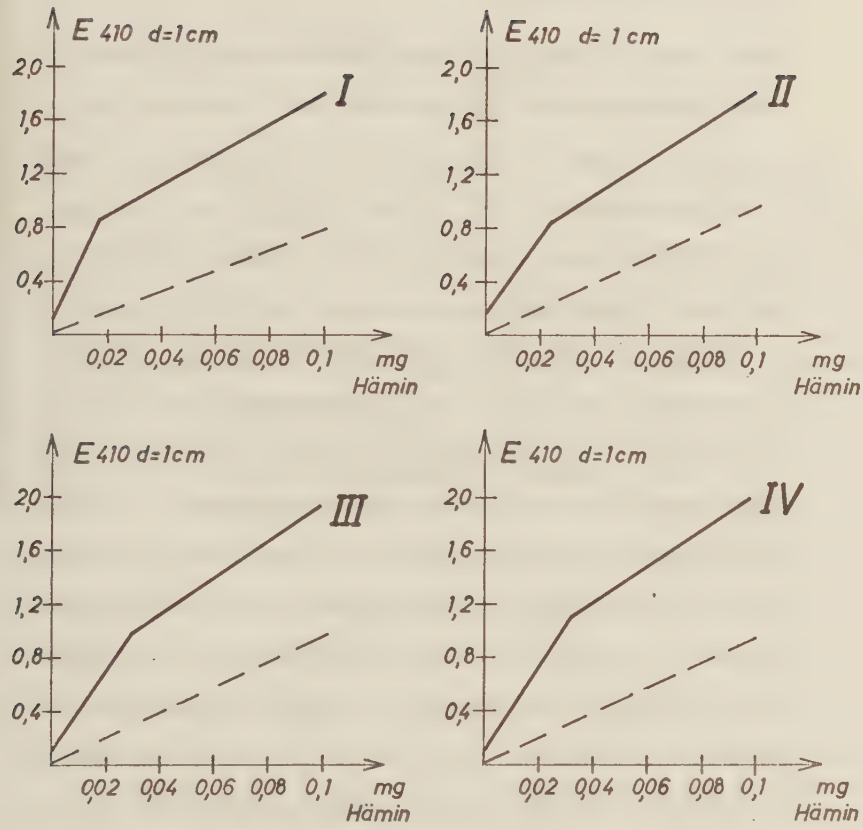


Abb.: 56

Rekombination mit Hämin

I Apomyoglobin + Hämin

II TFA Apomyoglobin + Hämin nach Abspaltung der TFA-Gruppe

III TFA-Benzyl.-Apomy. + Hämin nach Abspaltung d. Schutzgruppen

IV gekuppeltes (T_1 + T_2) + Hämin nach Abspaltung d. Schutzgruppen

Proteinkonz.: 0,1 mg / ml

— — — Häminlösung ohne Protein

2.2.7.3. UV-Spektren

Hämin bildet mit Myoglobin einen oktaedrischen Komplex, wobei 4 der 6 Liganden die N-Atome der Pyrrolkerne sind. Die 5. Position nimmt F8-Histidin des Proteins ein, während die 6. Koordinationsstelle von kleinen Liganden, wie H_2O, O_2, CO, OH und Basen besetzt sein kann. (142,143) Wie bei allen Eisen-Porphyrinkomplexen kommen auch bei Myoglobin Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Komplexe vor, die sich wiederum in ihren magnetischen Momenten unterscheiden können. (144 - 148) Das Spinmoment des Eisens ist abhängig von der Art der Liganden und steht in direktem Zusammenhang mit den Absorptionsspektren dieser Komplexe. (148 - 151) Die Brillschen Untersuchungen zeigten nämlich, daß nur bei high spin-Komplexen ausgeprägte Charge Transferbanden bei 600-650 und 450-500 nm auftreten, die dem Elektronenübergang Porphyrin $\rightarrow$ Eisen zuzuschreiben sind. Mit der Elektronenanregung ist eine beträchtliche Änderung des Dipolmoments und eine starke Absorption in den charge-transfer-Bereichen verbunden. Sowohl high spin- als auch low spin-Komplexe haben weitere Banden im sichtbaren Spektrum, die als α, ß, γ (Soret) Banden den π-Elektronenübergang im Porphyrin charakterisieren. Dabei ist die Intensität der α- und ß-Banden bei high spin-Komplexen gering und sie werden oft durch die Charge-transfer-Banden verdeckt. Bei low spin-Komplexen dagegen sind sie ausgeprägt und bestimmen das Spektrum. (152)

Besonders bei den Fe^{2+}-Komplexen werden diese spektroskopischen Unterschiede deutlich und können zur Identifizierung der entstandenen Häm-Apomyoglobinkomplexe herangezogen werden.

Fe^{2+}	5. Koordinationsstelle	6. Koordinationsstelle	Spin
Häm	——	——	low
Desoxymyoglobin	His(Protein)	——	high
Oxymyoglobin	His(Protein)	O_2	low
Myochromogen	His(Protein)	His(Protein)	low

Anhand der gemessenen Spinmomente müssen sich die Fe^{2+}-Spektren von ungebundenem Hämin und Desoxymyoglobin deutlich unterscheiden. (153,154)

Metmyoglobin, das bei der Einlagerung von Hämin ins native Apomyoglobin entsteht, bildet nämlich mit Desoxymyoglobin ein reversibles Redoxsystem, dessen Normalpotential bei PH 7 + 0,152 Volt beträgt. (155)

	Metmyoglobin	Desoxymyoglob.
Fe - Wertigkeit	3^+	2^+
Spin	low	high
Charge transfer	-	+
α, β Bande	+	-

Dabei ändert sich, wie in der Tabelle deutlich wird, sowohl die Wertigkeit des Eisens als auch das Spinmoment mit seiner charakteristischen Änderung im Absorptionsspektrum.

Ist also die Rekombination mit Häm gelungen, so muß nach der Reduktion mit Dithionit das high spin-Spektrum von Desoxymyoglobin entstehen. Nur dies ist fähig, reversibel O_2 zu binden. Ein typisches low spin-Spektrum dagegen erhält man nach der Reduktion, wenn Hämin entweder überhaupt nicht reagiert hat oder aber, wenn die 5. und 6. Koordinationsstelle mit Basen (Histidin des Proteins) besetzt sind. (156,157,158)
Um bessere Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurde zunächst das Hämochrom-Spektrum aufgenommen. (Abb.: 57)

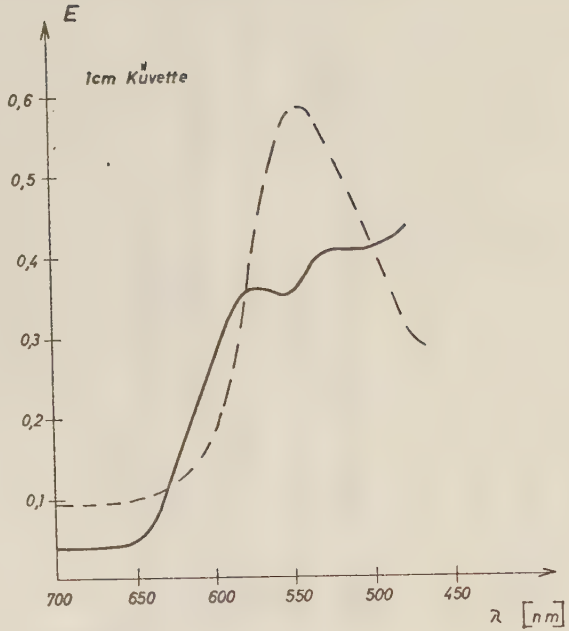


Abb.: 58

Absorptionsspektren

—— Metmyoglobin

— — Desoxymyoglobin

Proteinkonz.: - 0,33 mg / ml

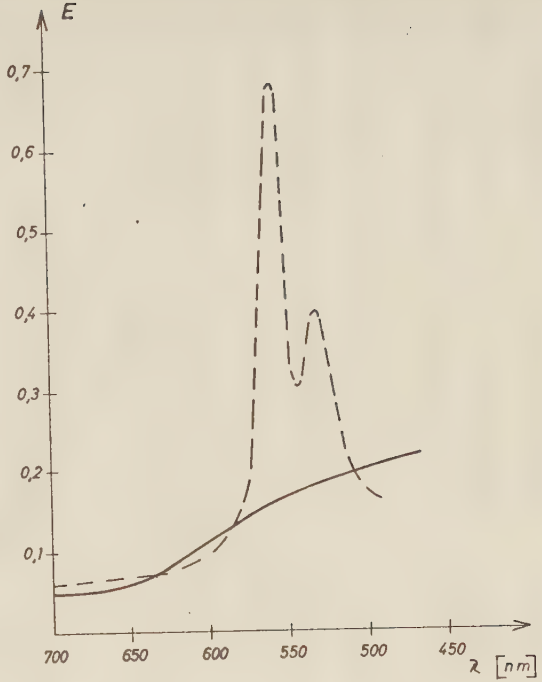


Abb.: 57

Absorptionsspektren

—— Hämochrom oxidierte Form

— — reduzierte Form

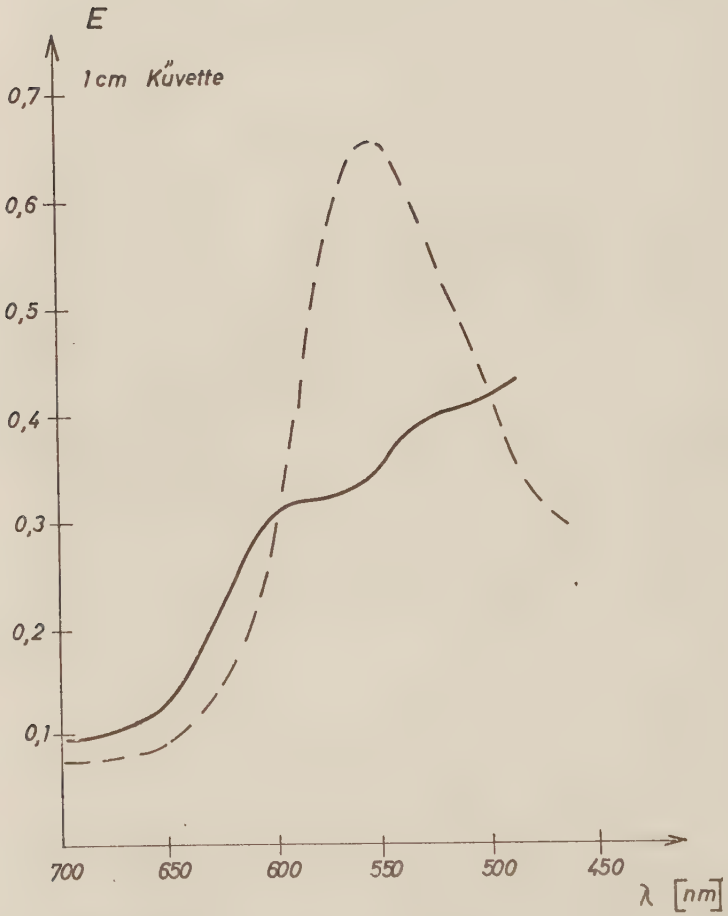


Abb.: 59

Absorptionsspektren

—— oxidierte } Form
– – – reduzierte

Apomyoglobin rekombiniert mit Hämin

Proteinkonz.: 0,35 mg / ml

Man sieht deutlich, daß das Fe^{3+}-Hämochromspektrum wenig charakteristisch ist. Nach der Reduktion mit Dithionit erhält man sehr schön die ausgeprägten α - und ß-Banden des low spin-Spektrums im Verhältnis 1 : 0,5.

Reduziertes Metmyoglobin dagegen liefert ein eindeutiges high spin-Spektrum mit der charge-transfer-Bande, die ihr Maximum bei 555 nm hat. (Abb.: 58) Die oxidierte Form zeigt ein Mischspektrum. Hier besteht ein Gleichgewicht zwischen den beiden Spinmomenten, die sehr stark vom pH abhängig sind. (159 - 161)

Vergleicht man nun diese beiden reduzierten Grundspektren mit denen, die das

1. Apomyoglobin + Hämin
2. TFA-Apomyoglobin + Hämin
3. TFA-Benzyl.-Apo + Hämin
4. T_1 und T_2-gekuppelt + Hämin

nach Abspaltung ihrer Schutzgruppen liefern (Abb.: 59 - 62), so sieht man, daß in allen Fällen das typische high spin-Spektrum von Desoxymyoglobin vorliegt. Das Maximum liegt jedesmal bei 555 nm. Hämin hat sich also richtig eingelagert und ist zur reversiblen Aufnahme von Sauerstoff bereit.

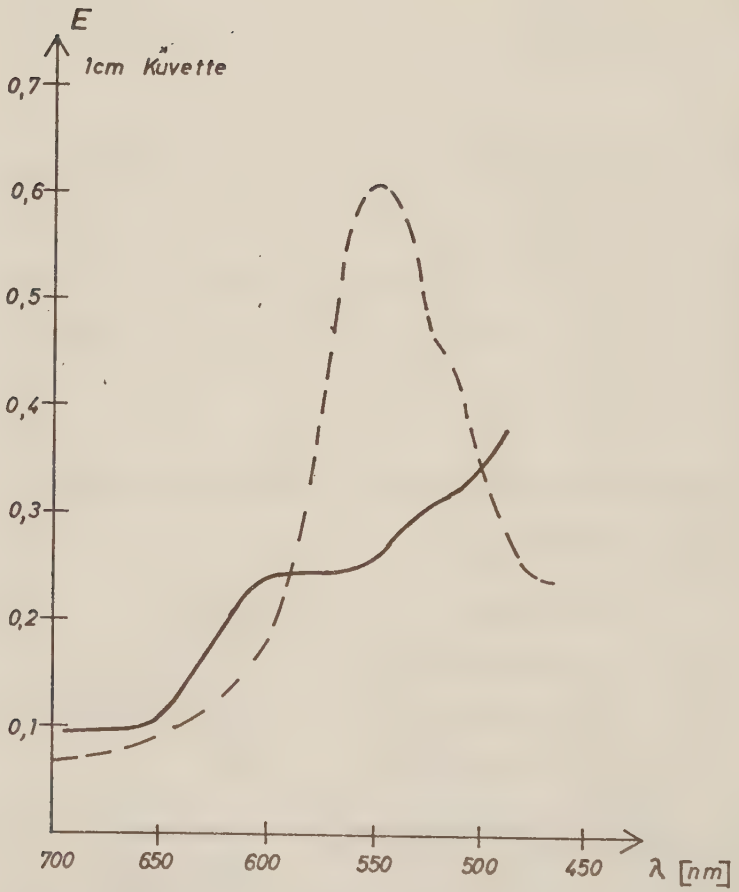


Abb.: 60

Absorptionsspektren

oxidierte } Form
reduzierte }

TFA-Apo rekombiniert mit Hämin nach Abspaltung der Schutzgruppe

Protein Konz.: 0,35 mg/ml

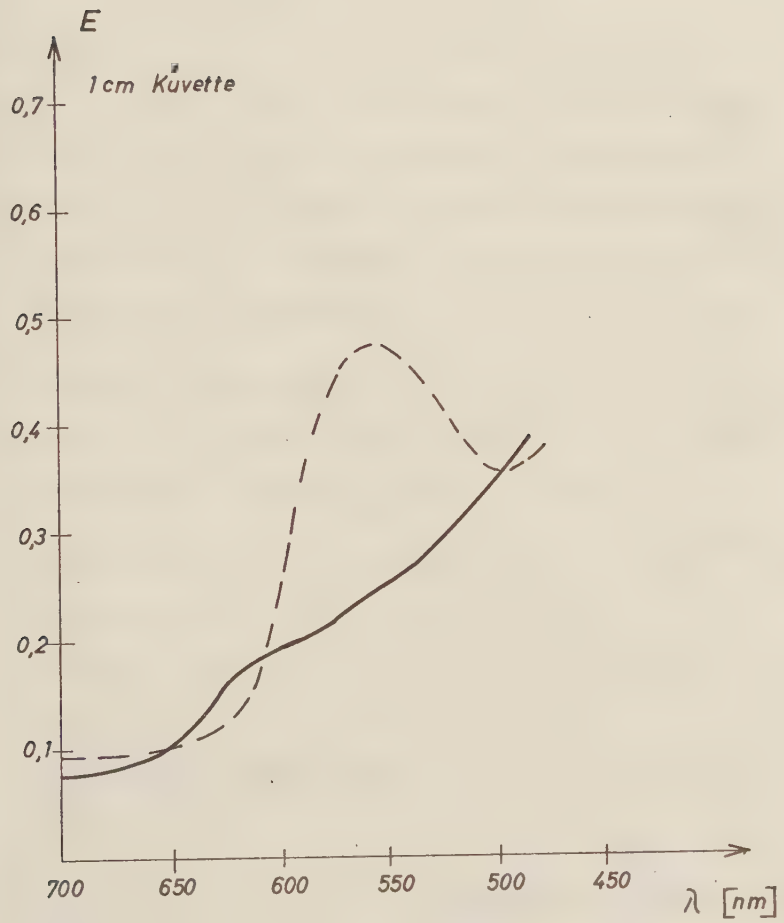


Abb.: 61

Absorptionsspektren

oxidierte / reduzierte } Form

TFA-Benzyl. Apo rekomb. mit Hämin nach Abspaltung der Schutzgruppen

Proteinkonz.: ~ 0,25 mg / ml

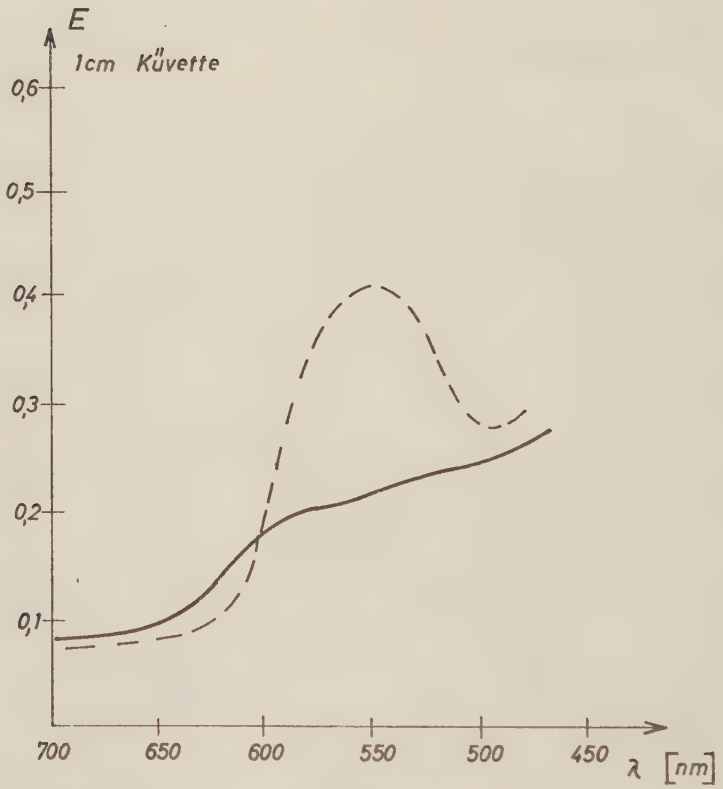


Abb.: 62

Absorptionsspektren

—— oxidierte
– – – reduzierte
} Form (T_1 + T_2) gekuppelt und rekombiniert mit Hämin

Proteinkonz.: ~ 0,25 mg/ml

2.2.8. Ergebnisse

Um Myoglobin aus natürlichen Proteinfragmenten synthetisieren zu können, mußten zunächst geeignete reversible Schutzgruppen für die reaktiven Seitenketten gefunden werden. Das heißt, sowohl die Blockierung als auch die Abspaltung dieser Schutzgruppen muß vollständig verlaufen, ohne das Protein irreversibel zu denaturieren.

Als bester Aminoschutz hat sich die Trifluoracetylgruppe erwiesen, deren Einführung mit Äthylthioltrifluoracetat und Abspaltung in 1 m Piperidin quantitativ verläuft.

Zur Blockierung der ε -Carboxylgruppen der Glutamin- und Asparaginsäure hat sich der Benzylester bewährt, dessen Einführung gleicherweise mit Phenyldiazomethan oder Benzylchlorid + Tetraäthylammoniumhydroxid erfolgen kann, wobei die zweite Methode zweifellos die einfachere ist. Mit Fluorwasserstoff läßt sich diese Schutzgruppe wieder vollständig abspalten. Die Katalytische Hydrierung, als einfache Abspaltungsmethode, war dafür nicht geeignet, da das Protein zum größten Teil irreversibel an den Palladiumkatalysator adsorbiert wurde.

Apomyoglobin, das aus Myoglobin durch Entfernen der prosthetischen Gruppe Hämin gewonnen wurde, wird trifluoracetyliert

und mit Trypsin gespalten. Dabei erhält man 3 Fragmente

$$\begin{aligned} \text{TFA-T}_1 \quad & 1 - 31 \\ \text{TFA-T}_2 \quad & 32 - 139 \\ \text{TFA-T}_3 \quad & 140 - 153, \end{aligned}$$

die durch Säulenchromatographie an Sephadexgelen getrennt und isoliert werden. Erst dann werden die Carboxylgruppen verestert, da mit zunehmendem Seitenkettenschutz die Löslichkeit in wäßrigem Medium stark abnimmt und dadurch die Verwendung von Enzymen zur Spaltung erschwert wird.

Vor der Kupplung der Fragmente TFA-T_1 und TFA-T_2, die nach dem DCC/OH-Suc-Verfahren erfolgt, wird von TFA-T_1-Arginin, das die Carboxylkomponente bei der Kupplung darstellt, der Benzylester mit Trypsin selektiv entfernt. Die Trennung von Ausgangsprodukten und die Isolierung des gekuppelten Produkts konnte nach Abspaltung der Benzylgruppen mit Fluorwasserstoff durch Chromatographie an einer G-50 Sephadexsäule erreicht werden.

Die Rekombinierfähigkeit des gekuppelten Produkts mit Hämin wurde nach der Entfernung der TFA-Gruppen bewiesen:

1. Der Helixgehalt als Kriterium nativen Myoglobins betrug nach der Rekombination 81 %

des Gesamtmyoglobins (Theoret. Wert 94 %)

2. Durch Einlagerung von Hämin wurde der Helixgehalt erhöht. Es ist bedingt durch die Wechselwirkung Protein - Hämin.

3. Mit Hilfe der Titrationskurve konnte die 1 : 1 Komplexbildung Protein : Hämin bestätigt werden.

4. Das UV-Spektrum zeigt das typische high spin-Spektrum von Desoxymyoglobin.

3. Experimenteller Teil

3.1. Ferredoxin

3.1.1. Gewinnung von Ferredoxin aus Clostridium pasteurianum und Clostridium acidi urici

500 g tiefgefrorene Clostridien-Zellpaste wird in 1 l destilliertem Wasser bei 5°C aufgetaut. Je 100 ml werden unter Eiskühlung 8 Minuten mit Ultraschall behandelt, um die Bakterienzellen aufzuknacken. Die Zellrückstände werden zentrifugiert (20 Minuten bei 13000 xg) und der Überstand mit 100 g DEAE Cellulose (Whatman DE 52) versetzt. Nach 12 Stunden Rühren bei 5°C ist das gesamte Ferredoxin an die Cellulose adsorbiert, die nun in einer breiten Säule mit Glasfritte (5 x 30 cm) gesammelt und mit Wasser so lange gewaschen wird bis die Lösung klar abläuft. Das Ferredoxin wird mit 1 m NaCl-Lösung (400 ml) eluiert und durch Ultrafiltration auf 100 ml eingeengt.

In 25-ml Portionen wird das Ferredoxin erst an einer G-25 Medium Sephadexsäule (100 x 3 cm), dann an einer G-50 Sephadexsäule (100 x 3 cm) mit 0,15 m Tris-HCl-Puffer pH 7,4 chromatographiert und in 200 Tropfen Fraktionen gesammelt, von denen die Extinktion bei 390 nm und 285 nm in einer 0,1 cm Küvette gemessen wird. Diejenigen Fraktionen mit einem Extinktionsverhältnis E 390/E 285 0,6 werden vereinigt und durch Ultrafiltration eingeengt. Die Pro-

teinkonzentration wird durch Extinktionsmessung E 390 nm bestimmt unter Verwendung der in der Literatur angegebenen Extinktionskoeffizienten.

	Clost. past,	Clost. acidi u.
Erhaltene Proteinmenge nach der Chromatographie an G-25/ G-50 Sephadexsäulen	147 mg	338 mg
E 390/E 285	0,67	0,69

Weiterverarbeitung

a.) Um die Ferredoxinlösungen frei von Nucleinsäuren zu erhalten, werden 0,1 mg DNase und 1 mg RNase zugesetzt. Nach 1 Stunde Reaktion bei Zimmertemperatur sind die Nucleinsäuren gespalten und ihre Abtrennung gelingt durch weitere Chromatographie an G-25 und G-50 Sephadexsäulen (100 x 3 cm). Das Ferredoxin wird wieder in 200 Tropfen Fraktionen aufgefangen. Diejenigen Fraktionen, die ein Extinktionsverhältnis E 390/E 285 0,7 haben, werden vereinigt und durch Ultrafiltration eingeengt.

	Clost. past.	Clost. acidi u.
Gesamtproteinmenge	112 mg	256 mg
E 390/E 285	0,75	0,77

Als letzter Reinigungsschritt folgt die Chromatographie an einer G-75 Sephadexsäule (100 x 3 cm) mit 0,15 m Tris-HCl-Puffer pH 7,4. Die Fraktionen mit einem Extinktionsverhältnis 0,77 werden vereinigt und durch Ultrafiltration eingeengt.

	Clost. Past.	Clost. acidi u.
Gesamtproteinmenge	85 mg	215 mg
E 390/E 285	0,78	0,8

b.) Gradientenelution

225 mg Ferredoxin werden an einer DEAE-Cellulosesäule (50 g) gesammelt und durch Gradientenelution gereinigt. Gradient: 0,05 m Tris-HCl-Lösung pH 7,4, die 0,01 - 0,1 m an $MgCl_2$ ist.

Ausbeute: 105 mg = 44,5 %

E 390/E 285: 0,77

3.1.2. Darstellung von Apoferredoxin

3.1.2.1. Darstellung von Apoferredoxin mit Trichloressigsäure

Zu 44 mg Ferredoxin, gelöst in 33,6 ml 0,015 m Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (0,05 m an Mercaptoäthanol), gibt man so lange 15%-ige Trichloressigsäure (0,05 m an Mercaptoäthanol) bis die Mischung 4 % an TCA (13,12 ml) ist. Während einer Stunde Reaktionszeit bei 5°C verschwindet unter H_2S-Entwicklung die braune Farbe vom Ferredoxin vollständig. Das ausgeflockte weiße Protein wird 10 Minuten bei 10000 xg

zentrifugiert, 3mal mit je 3 ml 0,023 m Ameisensäure (0,05 m an Mercaptoäthanol) gewaschen und in 12,5 ml 0,1 m Tris-HCl-Puffer pH 9 (0,05 m an Mercaptoäthanol) aufgelöst. Die unlöslichen Stoffe werden zentrifugiert und die überstehende Lösung 2mal an einer G-25 Sephadexsäule (100 x 3 cm) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 28,16 mg = 72,48 %

3.1.2.2. Darstellung von Apoferredoxin mit Dipyridyl

25 mg Ferredoxin werden 48 Stunden mit 10 ml einer 0,5%-igen Lösung von α,α'-Dipyridyl in 0,1 m Acetatpuffer pH 5,4 bei 0°C gerührt. Die Reaktionsmischung wird über eine Chelex-100-Säule (7 x 2 cm) geschickt und mit Wasser eluiert. Der Fe^{2+}-Dipyridyl-Komplex wird von Chelex-100 zurückgehalten, während das Apoferredoxin durchläuft. Das Eluat wird lyophilisiert und an einer G-25 Sephadexsäule (100 x 3 cm) chromatographiert.

Ausbeute: 12,5 mg = 56,56 %

3.1.2.3. Darstellung von Apoferredoxin mit Mersalylnatrium

Zu 157 mg Ferredoxin, gelöst in 69 ml 0,015 m Tris-HCl-Puffer pH 7,4 gibt man 483 mg Mersalyl-Natrium [Natriumsalz von o-(2-Methoxy-3-hydroxy mercuriopropyl-carbamyl)-phenoxyessigsäure]. Nach 2 Minuten Reaktion bei Zimmertemperatur erhält man ein mersalylhaltiges, eisenfreies Pro-

tein. Die Entfernung des Eisens erfolgt an einer Chelex-100-Säule. Das überschüssige Salz wird durch mehrmalige Chromatographie an einer G-25 Sephadexsäule (100 x 3 cm) entfernt.

Ausbeute: 60 mg = 43,29 %

3.1.3. Resynthese von Ferredoxin

5 mg Clostridien Apoferredoxin werden in 4 ml 0,05 m Tris-HCl-Puffer pH 7,3 gelöst. Die zur Resynthese notwendigen Reagenzien werden in folgender Reihenfolge und Menge zugeben: 0,1 ml 2-Mercaptoäthanol, 0,5 ml einer 0,4%-igen wäßrigen Lösung von $Na_2S \cdot 9\ H_2O$ und 0,5 ml einer 0,5%-igen wäßrigen Lösung von $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, die mit 2 Tropfen Mercaptoäthanol stabilisiert wurde. Nach 15 Minuten Reaktionszeit bei Zimmertemperatur und 24 Stunden bei 5°C wird das Reaktionsgemisch auf eine DEAE-Cellulosesäule (3 x 0,5 cm) aufgetragen. Die Säule wird mit 50 ml 0,2 m NaCl-Lösung gewaschen und entstandenes Ferredoxin mit 0,8 m NaCl-Lösung eluiert. Das Extinktionsverhältnis E 390/E 285 und die Proteinmenge im Eluat werden bestimmt.

Ist zu einer erfolgreichen Resynthese eine Vorbehandlung des Apoferredoxins mit Harnstoff und 2-Mercaptoäthanol notwendig, wird diese wie folgt ausgeführt:
Zu einer Lösung von 5 mg Apoferredoxin in 4 ml Tris-HCl-Puffer pH 8,5 werden 2 g Harnstoff und 0,1 ml Mercapto-

äthanol gegeben. Nach 4 Stunden Reaktionszeit bei Zimmertemperatur wird die Resynthese wie oben angegeben durchgeführt. Die Isolierung des Ferredoxins erfolgt nach Verdünnen der Lösung mit 0,05 m Tris-HCl-Puffer pH 8,5 (1 : 6) an DEAE-Cellulose wie oben angegeben.

3.1.4. Trypsinspaltung

10 mg Apoferredoxin werden in 5 ml 0,1 m Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 0,02 ml Trypsinlösung + TCPK (10 mg/ml 0,001 n HCl). Nach 2 Stunden Reaktionszeit bei Zimmertemperatur ist die Spaltung beendet.

3.1.4.1. Test auf Trypsinspaltung mit Carboxypeptidase B

1 mg mit Trypsin gespaltenes Apoferredoxin wird in 0,5 ml Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gelöst und eine Stunde bei Zimmertemperatur mit 10 µl Carboxypeptidase B inkubiert. Die durch Carboxypeptidase B abgespaltene Argininmenge wird mittels Aminosäureanalyse bestimmt.

3.1.4.2. Edman Abbau

0,5 µ Mol lyophilisiertes, trypsingespaltenes Apoferredoxin werden in 0,2 ml Pyridin/Wasser 1 : 1 gelöst, das mit Trimethylamin auf pH 9 gebracht wurde. Nach der Zugabe von 5 µl Phenylisothiocyanat wird das Reaktionsgefäß (kleines Reagenzglas) mit Stickstoff gespült und verschlossen. Die Reaktionsmischung wird 1 Stunde bei 40°C inkubiert, danach

5mal mit 1 ml Benzol extrahiert und die wäßrige Phase lyophilisiert. Das trockene Produkt wird in 1 ml Trifluoressigsäure aufgelöst und unter Stickstoff 15 Minuten bei 40°C inkubiert. Das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom abgezogen und der Rückstand 2mal mit 1-Chlorbutan gewaschen. Die 1-Chlorbutanextrakte werden vereinigt und im N_2-Strom getrocknet. Nach der Zugabe von 0,2 ml 1 n HCl wird 10 Minuten bei 80°C unter Stickstoff inkubiert und die Lösung anschließend 3mal mit Äthylacetat extrahiert. Die Extrakte werden vereinigt, im N_2-Strom getrocknet und in 20 µl Äthylacetat gelöst. Die N-terminalen Aminosäuren werden mittels DC-Chromatographie auf Kieselgelplatten, die einen Fluoreszenzindikator enthalten, identifiziert.

3.1.5. Sulfonierungsexperimente

3.1.5.1. Darstellung und Messung der radioaktiven Lösung

Zu den Sulfonierungsexperimenten wurden 100 ml einer radioaktiven 0,7 m $Na_2{}^{35}SO_3$-Lösung angesetzt mit einer Totalaktivität von 1,04 mC = $2{,}28 \cdot 10^9$ dpm (Zerfälle pro Minute).

Die Scintillationsausbeute, die vom Meßgerät und dem radioaktiv markierten Atom abhängt, wurde mittels Standardmessungen bestimmt. Sie betrug 65 %.

Von 32000 dpm, die in 0,0014 ml der radioaktiven $Na_2{}^{35}SO_3$-Lösung (= 1 µ Mol) stattfinden, können 20800 cpm (gezählte

Zerfälle pro Minute) gemessen werden.

3.1.5.2. Sulfonierung mit $CuSO_4$

7,4 mg Apoferredoxin werden in 0,37 ml Wasser gelöst, das mit NH_3 auf pH 9 gebracht wurde. Dazu gibt man 0,296 ml einer Lösung von 1 m Mol $CuSO_4$ in 40 ml Wasser und 0,074 ml einer 0,7 m $Na_2{}^{35}SO_3$-Lösung. Nach 2 Stunden Reaktionszeit bei Zimmertemperatur und 22 Stunden Reaktionszeit bei 5°C wird die Reaktionsmischung durch zweimalige Chromatographie an einer G-25 Sephadexsäule (100 x 3 cm) gereinigt und das vom überschüssigen $Na_2{}^{35}SO_3$ befreite Proteineluat lyophilisiert.

3.1.5.3. Sulfonierung mit $CuSO_4$ und Cystein

6 mg Apoferredoxin werden in 3,2 ml 0,1 m Tris-HCl-Puffer pH 8,4 gelöst. Die zur Sulfonierung notwendigen Reagenzien werden in folgender Reihenfolge und Menge zugegeben:

1,92 g Harnstoff (Lösung ist dann 8 m an Harnstoff)
0,1 ml $CuSO_4$-Lösung (= 0,00144 mg $CuSO_4$)
0,1 ml Cysteinlösung (= 0,124 mg)
0,6 ml Na_2SO_3-Lösung (= 50,4 mg)

Nach 2 Stunden Reaktionszeit bei Zimmertemperatur und 22 Stunden bei 5°C wird die Reaktionsmischung durch zweimalige Chromatographie an einer G-25 Sephadexsäule (100 x 3 cm)

gereinigt. Das vom überschüssigen Na_2SO_3 befreite Proteineluat wird lyophilisiert.

3.1.6. Proteinbestimmung

3.1.6.1. UV-Messung

Zur Proteinbestimmung der Ferredoxinlösungen wird die Extinktion bei E 390 gemessen, der aus der Literatur bekannte molare Extinktionskoeffizient in die Gleichung

$$E\ 390 = \varepsilon \cdot c \cdot d.$$

eingesetzt und daraus die Konzentration bestimmt.

	Clost. past.	Clost. acidi u.
Molekulargewicht	6000	6232
Extinktionskoeffizient	21000	30600
E 390 (1 cm Küv.)	3,5 = 1 mg/ml	4,91 = 1 mg/ml

3.1.6.2. Folin-Test

Der Folinproteintest ist ein halb=quantitativer Test.

Reagenz A : 2 % Na_2SO_3 in 0,1 m NaOH

Reagenz B : 0,5 % $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ in 1%-iger Na-Citratlösung

Reagenz C : 50 ml A + 1 ml B (stets frisch zubereiten)

Reagenz E : Folinreagenz wird 1 : 3 mit Wasser verdünnt (stets frisch zubereiten)

3.1.7. Aminosäureanalyse

Zu 4,72 mg Ferredoxin, gelöst in 4 ml Tris-HCl-Puffer pH 7,4 gibt man 4 ml konz. HCl und 0,02 ml Thiophenol. Die Ampulle wird evakuiert, abgeschmolzen und 22 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Das Hydrolyseprodukt wird zur Trockene eingedampft und mit Hilfe des Aminosäurenalysators charakterisiert.

3.2. Myoglobin

3.2.1. Darstellung der Ausgangssubstanzen

3.2.1.1. Darstellung von Apomyoglobin

Bei der Darstellung von Apomyoglobin werden 200 mg Pferdemyoglobin MG: 17624 in 20 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure unter Verwendung eines pH-Meters auf pH 1,5 gebracht. Nach 3 Stunden Reaktionszeit bei 4°C wird Hämin zunächst mit 20 ml, dann mit 10 ml Methyläthylketon extrahiert. Die leicht bräunlich gefärbte wäßrige Proteinlösung wird sofort gegen Natriumbicarbonatlösung (100 mg/l) dialysiert. Nach mehrmaligem Wechsel des $NaHCO_3$-Dialysewassers wird nochmals gegen ausreichende Mengen Wasser dialysiert.

Es läßt sich leider nicht vermeiden, daß während der Dialyse gewisse Mengen an Protein ausfallen. Der Niederschlag wird zentrifugiert und der Proteingehalt in der überstehenden Lösung durch UV-Messung bestimmt.

E 280 in 0,1 cm Küv.	Proteingehalt (mg/ml)	Gesamtvolumen (ml)	Ausbeute (mg)	Ausbeute (%)
0,355	4,22	33	132	66

3.2.1.2. Darstellung von TFA-Apomyoglobin

4 g (= 227 µ Mol) Apomyoglobin in 500 ml Wasser werden mit dem Magnetrührer so stark wie möglich gerührt, ohne jedoch Schaum zu verursachen. Mit 4 n KOH wird der pH auf 10 gebracht und während der ganzen Reaktion beibehalten. Es wird ein möglichst breites Becherglas als Reaktionsgefäß gewählt, da eine große Oberfläche benötigt wird. 100 ml Äthylthioltrifluoracetat werden in kleinen Portionen, da es mit Wasser nicht mischbar ist, zugegeben. Die Reaktion ist beendet, wenn keine KOH mehr verbraucht wird. Nach mehrmaliger Dialyse, zuerst gegen $NaHCO_3$ (100 mg/l) und dann gegen Wasser, erhält man nach der Gefriertrocknung ein weißes, voluminöses Produkt.

Ausbeute: 3,5 g = 87 %

3.2.1.3. Darstellung von Citraconyl-Apomyoglobin

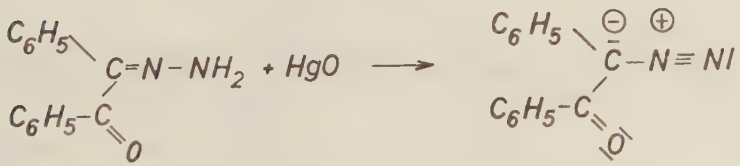
Mit NaOH wird der pH von 900 mg Apomyoglobin in 125 ml Wasser auf 8,5 gebracht. Während der Zugabe von 5 x 0,5 ml Citraconsäureanhydrid wird dieser pH mittels eines pH-Stats und Titration mit 5 n NaOH beibehalten. Wird keine

NaOH mehr verbraucht, ist die Reaktion beendet. Die Lösung wird durch Dialyse gegen Wasser (mit NH_3 auf pH 9 gebracht) von den Reaktionsprodukten befreit und durch Ultrafiltration eingeengt.

E 280 in 0,1 cm Küv.	Proteingehalt (mg/ml)	Gesamtvolumen (ml)	Ausbeute (mg)	Ausbeute (%)
2,772	33	25	825	91,8

Der Proteingehalt wurde wieder mittels UV-Messung bestimmt.

3.2.1.4. Darstellung von Azibenzil



Benzylmonohydrazon Azibenzil

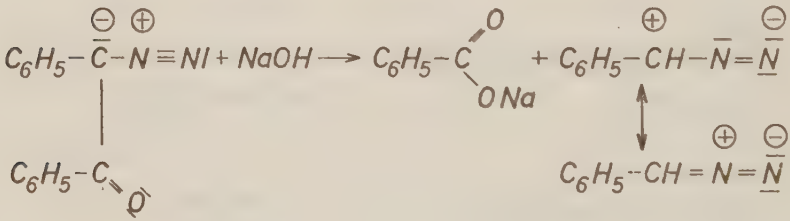
30 g (= 0,134 m) Benzylmonohydrazon werden in einem Mörser mit 60 g (0,28) gelbem HgO und 15 g Na_2SO_4 (wasserfrei) vermischt, in einen 500 ml Glaskolben eingefüllt und mit 200 ml Äther bedeckt. 4 ml einer kalten,

gesättigten, alkoholischen KOH-Lösung werden zur Katalyse der Reaktion hinzugefügt. Die Mischung wird 10 - 15 Minuten geschüttelt und ohne Vakuum durch ein Papierfilter filtriert. Der Rückstand wird so lange mit Äther gewaschen bis die Flüssigkeit farblos abläuft. Die Ätherextrakte werden am Wasserstrahlvakuum bis 40°C zur Trockene eingedampft und auf einem Tonteller getrocknet. Das orange Produkt wird aus absolutem Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 26 g (87 % der Theorie)

Das Produkt zersetzt sich bei 79°C.

3.2.1.5. Darstellung von Phenyldiazomethan



5,5 g Azibenzil werden in 125 ml Äther gelöst. Dazu gibt man eine Lösung von 8 g NaOH in 15 ml Wasser und 105 ml Methanol. Das Gefäß wird locker mit Watte verschlossen und 10 Stunden bei Zimmertemperatur im Dunklen gehalten. Ist die Reaktion beendet, so verdünnt man das Reaktionsprodukt mit 25 ml Äther und fügt 100 ml wäßrige 10 %

naOH zu der klaren, roten Lösung hinzu. Die Ätherschicht wird zunächst 6mal mit je 25 ml 10 % wäßrige KOH gewaschen, dann spült man mit Wasser so lange bis der Ätherextrakt basenfrei ist. Die Ätherlösung wird mit Na_2SO_4 getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.1.6. Darstellung des Pd-Katalysators

10 g $PdCl_2$ werden unter Rühren in 50 ml 6 n HCl gelöst und durch ein Faltenfilter filtriert. Diese Lösung gibt man unter Rühren in 600 ml siedendes destilliertes Wasser und tropft 2mal konzentrierte Ameisensäure dazu. Mit 5 n KOH (100 ml) wird der pH auf 9 gebracht. Dabei fällt ein großer Teil des Pd aus. Den Rest des Pd gewinnt man durch erneute Zugabe von Ameisensäure bis pH 7. Das amorph angefallene Pd wird 8mal mit destilliertem Wasser und 3mal mit Methanol unter Rühren gewaschen. Der Katalysator wird verschlossen unter Methanol aufbewahrt.

3.2.2. Darstellung und Isolierung von Fragmenten

3.2.2.1. Einfache Trypsinspaltung

1 g TFA-Apomyoglobin wird in 40 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 0,05 n NaOH auf pH 8,8 gebracht. Unter Rühren gibt man 1 ml Trypsinlösung + TCPK-Inhibitor (10 mg/ml 0,001 n HCl) hinzu. Die Spaltung wird am schreiben-

den Titrator verfolgt, indem die freigewordenen Carboxylgruppen mit 0,05 n NaOH titriert werden. Eine weitere Portion Trypsinlösung fügt man nach 3 Stunden hinzu. Nach etwa 14 Stunden ist die Spaltung beendet und man lyophilisiert das erhaltene Gemisch.

3.2.2.2. Spaltung mit Trypsin in Gegenwart von 2 m Hydrazin

Zu 500 mg TFA-Apomyoglobin (Citraconyl-Apomyoglobin), die in 20 ml Wasser gelöst sind, gibt man 1 ml NH_2NH_2 hinzu, so daß die Lösung 2 m an Hydrazin ist. Mit konzentrierter HCl wird der pH ganz langsam unter starkem Rühren auf 8,5 gebracht. Dann wird 1 ml Trypsinlösung + TCPK-Inhibitor (10 mg/ml 0,001 n HCl) hinzugefügt und die Spaltung am pH-Stat durch Titration mit 0,05 n NaOH verfolgt. Die Spaltung verläuft äußerst langsam und ist erst nach 30 Stunden beendet.

3.2.2.3. Isolierung der Spaltstücke

Nach der Spaltung wird das Gemisch lyophilisiert, in wenig H_2O gelöst und an einer G-50 Sephadex fine Säule (210 x 5 cm) chromatographiert. Als Elutionsmittel dient 0,05 m $NaHCO_3$. Dabei erhält man 3 peaks TFA-T_1, TFA-T_2 und TFA-T_3. Jeder dieser Peaks wird zur weiteren Reinigung über eine G-25 Sephadexsäule geschickt (180 x 35 cm), mit 0,05 m $NaHCO_3$ eluiert und lyophilisiert.

3.2.3. Carboxylschutzgruppen

3.2.3.1. Veresterung von TFA-Apomyoglobin mit Dicyclohexylcarbodiimid und Diäthylenglycolmonomethyläther

17 mg (1 µ Mol) TFA-Apomyoglobin werden in wenigst DMF gelöst. Nachdem man durch Zugabe von 30 µ Mol Essigsäure das Na-Salz in die freie Säure überführt hat, gibt man 6,18 mg (30 µ Mol) DCC und einen 2-fachen Überschuß an Diäthylenglycolmonomethyläther (7,2 mg = 60 µ Mol) dazu. Nach 3 Tagen Reaktionszeit bei Zimmertemperatur wird das veresterte Produkt mit Wasser gefällt und gefriergetrocknet.

3.2.3.2. Veresterung von TFA-Apomyoglobin mit chloriertem Diäthylenglycolmonomethyläther

3.2.3.2.1. Darstellung von chloriertem Diglyme (162)

12 g Diglyme werden in 100 ml Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 3,6 g Paraformaldehyd wird gekühlt und 90 Minuten HCl-Gas eingeleitet. Durch Schütteln mit wasserfreiem $CaCl_2$ und gleichzeitigem Durchleiten von N_2 wird die Lösung getrocknet.

3.2.3.2.2. Veresterung

Zu 17 mg (1 µ Mol) TFA-Apomyoglobin, gelöst in wenigst DMSO gibt man 36 µ Mol (20 % Überschuß) NR_4 und 150

µ Mol (50 % Überschuß) chloriertes Diglyme dazu. Bei Zimmertemperatur wird 2 Tage gerührt, das Reaktionsprodukt mit Wasser gefällt und gefriergetrocknet.

3.2.3.3. Veresterung der Carboxylgruppen mit Phenyldiazomethan

100 mg TFA-Apomyoglobin werden in wenig 85 % Methanol gelöst. Durch Zugabe von 85 % Methanol, das 0,01 m an HCl ist, erreicht man pH 5, der während der folgenden Reaktion mit Hilfe eines pH-Stats durch Titration mit 85 % Methanol (0,01 m an HCl) beibehalten wird. Die ätherische Lösung von Phenyldiazomethan wird nun so lange hinzugetropft bis keine HCl mehr verbraucht wird. Im Rotationsverdampfer wird das Reaktionsprodukt unter Hochvakuum getrocknet und 2mal mit Äther extrahiert. Der Rückstand wird in 0,5 ml 1,1,1,3,3,3, Hexafluoropropanol-2 gelöst und mit Pyridin/Wasser 1 : 1 aufs 100-fache verdünnt und lyophilisiert.

Ausbeute: 85 mg

3.2.3.4. Veresterung der Carboxylgruppen mit Benzylchlorid und Tetraäthylammoniumhydroxyd

3.2.3.4.1. Veresterung von Boc-Glycin

4,07 g Boc-Gly (0,25 Mol) und 4,41 g (0,3 Mol) Tetraäthylammoniumhydroxyd werden in 50 ml DMSO gelöst. Nach

der Zugabe von 4,75 g (0,375 Mol) Benzylchlorid läßt man die Reaktionsmischung 24 Stunden bei Zimmertemperatur rühren und zieht dann das DMSO am Hochvakuumrotationsverdampfer ab. Es fällt ein gelbes Öl an.

3.2.3.4.2. Veresterung von TFA-Apomyoglobin

200 mg TFA-Apomyoglobin (5,88 µ Mol) werden in wenig Wasser gelöst und auf eine Säule (1,5 x 10 cm), gefüllt mit Ionenaustauscher Bio Rex 70, aufgetragen. Das Produkt wird mit Wasser, das mit N$\overline{\overline{\equiv}}$ auf pH 8,8 gebracht wurde, eluiert und lyophilisiert. Nach dem Lösen in 2 ml DMSO gibt man 264,75 µ Mol (50 % Überschuß) Benzylchlorid hinzu und läßt die Mischung 2 Tage bei Zimmertemperatur rühren. Das Protein wird mit Wasser gefällt, gewaschen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 120 mg (60 %)

3.2.4. Kupplung von TFA-T_1 und TFA-T_2

3.2.4.1. Verseifung von TFA-T_1-Arginin

85 mg (20,4 µ Mol) mit Benzylchlorid und Tetraäthylammoniumhydroxyd verestertes T_1 werden in 10 ml Pyridin/Wasser 1 : 1 gelöst. Nach Zugabe von 0,3 ml Trypsinlösung (10 mg/ml 0,001 n HCl) wird über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Protein wird dann mit Wasser gefällt, gewaschen und

lyophilisiert.

Ausbeute: 50 mg (59 %)

3.2.4.2. Kupplungsreaktion (163)

8,2 mg (2,2 µ Mol) TFA-T_1 und 2,2 µ Mol Hydroxysuccinimid werden in wenig DMF gelöst. Dazu gibt man eine Mischung von 34 mg (2,2 u Mol) TFA-T_2 und 2,2 µ Mol Triäthylamin, das in wenigst DMF gelöst ist. Nach Zugabe von 2,2 µ Mol Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in wenig DMF, läßt man die Reaktionsmischung 4 Tage bei Zimmertemperatur rühren. Mit Äther wird das Produkt gefällt, gewaschen und lyophilisiert.

Ausbeute: 30 mg (71 %)

3.2.5. Abspaltung der Schutzgruppen

3.2.5.1. Abspaltung der TFA-Gruppen

100 mg TFA-Apomyoglobin werden in 5 ml 1 m Piperidin, die 8 m an Harnstoff sind, gelöst und sofort für 2 Stunden in ein Eisbad gestellt. Danach wird der pH mit fester Borsäure auf 8 gebracht. Zur Reinigung wird das Produkt auf eine G-25 grob Sephadexsäule aufgetragen, mit 0,08 m Borat eluiert und dann der Proteinpeak durch Ultrafiltration eingeengt.

Ausbeute: 72,95 mg (10 mg/ml)

3.2.5.2. Abspaltung der Benzylestergruppen

3.2.5.2.1. Abspaltung durch Hydrierung

In die Schüttelente der Hydrierapparatur gibt man einen halben Löffel Palladiumkatalysator und 10 - 20 ml Methanol. Im Probenteil befinden sich 7,5 mg TFA-Benzyl. Protein gelöst oder suspendiert in 2 ml Methanol. Mit Wasserstoff wird zunächst der Palladiumkatalysator aktiviert und dann die Probe zugegeben. Nach einer Reaktion von 12 Stunden wird der Katalysator abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Die Methanolfraktionen werden im Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur eingedampft.

Ausbeute: 2,25 mg (30 %)

3.2.5.2.2. Abspaltung mit Fluorwasserstoff

In 200 mg TFA-Benzyl-Apomyoglobin wird 10 Minuten HF eingeleitet. Durch das Kühlen der Probenflasche wird HF flüssig und löst das Protein völlig auf. Nach 1 Stunde Rühren bei 0°C wird HF mit Stickstoff abgeblasen und der Rückstand über NaOH im Vakuum getrocknet. Das Produkt wird in Eisessig gelöst, unlösliche Stoffe zentrifugiert, mit Wasser verdünnt und lyophilisiert.

Ausbeute: 170 mg (85 %)

3.2.6. Tests

3.2.6.1. Proteinbestimmung

3.2.6.1.1. UV-Messung

Die Konzentration von Apomyoglobin kann durch Messen der Extinktion bei 280 nm (Zeiss PMG) bestimmt werden, wenn man die in der Literatur angegebenen Extinktionskoeffizienten für Apomyoglobin übernimmt.

E 280 = 8,4 (1 cm Küvette) entspricht
einer 1 % Apomyoglobinlösung.

3.2.6.1.2. Aminosäureanalyse

Zu der zu untersuchenden Proteinlösung wird so lange konzentrierte HCl gegeben bis die Lösung 6 n an HCl ist. Sie wird in ein Hydrolyserohr gefüllt und abgeschmolzen. Nach 24 Stunden Reaktionszeit bei 120°C ist die Totalhydrolyse des Proteins beendet. Die Probe wird am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und auf die Säule des Aminosäureanalysators in einem geringen Volumen aufgetragen. Die µ Mol Mengen der einzelnen Aminosäuren des Ninhydrinchromatogramms werden berechnet durch Vergleich mit den bekannten Standartwerten eines Testlaufs. Aus dem bekannten Auftragevolumen der jeweiligen Probe und den erhaltenen

µ Mol Mengen der Aminosäuren kann wiederum die Konzentration einer Proteinlösung bestimmt werden.

3.2.6.2. Enzymatische Tests

3.2.6.2.1. Test auf Trifluoracetylierung

1 mg TFA-Apomyoglobin wird in 0,5 ml Wasser gelöst und mit 5 λ Trypsinlösung (10 mg/ml 0,001 n HCl) versetzt. Nach 1 Stunde Reaktionszeit bei Zimmertemperatur fügt man 5 λ Carboxypeptidase B hinzu, die wiederum 1 Stunde Reaktionszeit benötigt. Danach wird anhand der Aminosäureanalyse das Arginin/Lysin-Verhältnis bestimmt.

3.2.6.2.2. Test auf Spaltung mit Trypsin

Zu 1 mg gespaltenem, in 0,5 ml Wasser gelöstem TFA-Produkt gibt man 5 λ Carboxypeptidase B. Sie spaltet nur das Arginin ab, das durch Trypsin freigelegt wurde. Die Menge Arginin wird durch die Aminosäureanalyse bestimmt und daraus der Spaltungserfolg berechnet.

3.2.6.2.3. Test auf Veresterung

3.2.6.2.3.1. Mit Papain und Aminopeptidase M - Verdauung

25 mg TFA-Protein (verestert) werden in 8 ml Wasser ge-

löst und mit 1 n NaOH auf pH 7 gebracht. Auf dem Wasserbad wird das Reaktionsgemisch 3 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach der Abkühlung gibt man 2 ml 0,2 n Na-Acetatpuffer dazu und inkubiert 10 Minuten bei 40°C. Nachdem man 1,1 ml 0,1 m KCN-Lösung pH 7 hinzugefügt hat, gibt man noch 0,2 ml = 2 mg Papain dazu. 24 Stunden wird nun bei 40°C inkubiert und dann lyophilisiert. Der Rückstand wird in 2 ml n/15 Phosphatpuffer pH 7 aufgelöst und mit 1 ml Aminopeptidase M versetzt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wird die Lösung nach eventuellem Zentrifugieren am Rotationsverdampfer getrocknet und die freigesetzten Aminosäuren durch Aminosäureanalyse bestimmt.

3.2.6.2.3.2. Mit Pepsin und Aminopeptidase M

25 mg verestertes TFA-Protein werden in 8 ml Wasser gelöst und mit Essigsäure auf pH 2,8 gebracht. Nachdem man 1 mg Pepsin hinzugegeben hat, wird 2 Tage bei Zimmertemperatur inkubiert und die Lösung lyophilisiert. Der Rückstand wird in Phosphatpuffer pH 7 aufgenommen und 1 ml Aminopeptidase M hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C wird die Lösung nach dem Zentrifugieren am Rotationsverdampfer zur Trockene

eingedampft und die freigesetzten Aminosäuren durch die Aminosäureanalyse bestimmt.

3.2.6.2.3.3. Mit Trypsin und Carboxypeptidase bei den Fragmenten TFA-T_1 und TFA-T_2

Als Maß für die Veresterung dient der Veresterungsgrad von carboxylendständigem Arginin.
1 mg TFA-verestertes T_1 (T_2) wird in 0,5 ml Pyridin/Wasser 1 : 1 gelöst. Dazu gibt man 5 λ Carboxypeptidase B. Nach 1 Stunde Inkubation bei Zimmertemperatur wird die Menge des freigesetzten Arginins bestimmt.
Ist Arginin verestert, so wird von der Carboxypeptidase B kein Arginin freigesetzt. Carboxypeptidase spaltet nur ungeschütztes Arginin.

3.2.6.2.4. Test auf gelungene Kupplung

Zu 1 mg gekuppeltem TFA-T_1—— T_2 (trifluoracetyliert und verestert), das in 0,5 ml Pyridin/Wasser 1 : 1 gelöst wird, gibt man 5 λ Carboxypeptidase B. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wird durch die Aminosäureanalyse die freigesetzte Argininmenge bestimmt. Ist die Kupplung gelungen, so darf kein Arginin auftreten.

3.2.6.3. Tests auf Einlagerung von Hämin

3.2.6.3.1. Titrationskurve

10 Reagenzgläser werden mit je 1 ml Proteinlösung gefüllt (0,5 mg/ml). Dazu gibt man 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 120, 150 µl Häminlösung (10 mg Hämin werden in 1 ml 0,1 n NaOH gelöst und auf 10 ml mit Boratlösung aufgefüllt), so daß sich im ersten Glas 10 µl, im letzten Glas 150 µl Hämin befinden. Nach 1 Stunde Inkubation bei Zimmertemperatur gibt man zu jedem Glas 5 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 6,5 und mißt die jeweilige Extinktion bei 410 nm in einer 1 cm Küvette. Trägt man die Messwerte in ein Koordinatensystem mit E als y-Achse und mg Hämin als x-Achse ein, so erhält man die Titrationskurve.

Um die Eigenabsorption von Hämin, das ja in steigendem Maß zugegeben wird, zu berücksichtigen, wird eine Blindprobenkurve hergestellt. 10 Reagenzgläser werden mit je 1 ml Boratlösung statt Proteinlösung gefüllt und nach Zugabe der gleichen Mengen Hämin wie oben bei 410 nm vermessen.

3.2.6.3.2. UV-Spektren

Der aus den Titrationskurven ermittelte Knickpunkt zeigt

die Menge Hämin an, die maximal von 0,1 mg des jeweiligen Proteins komplexisch gebunden wird. Von solchen Lösungen mit maximaler Häminbindung werden UV-Spektren 700 - 450 nm der oxidierten und reduzierten Form rekombinierten Proteins aufgenommen.

Und zwar von:

	mg Protein/ml	mg Hämin/ml Protein
Apomyoglobin	0,35	0,0665
TFA-Apomyoglobin	0,35	0,0805
TFA-Benzyl.-Apo	0,25	0,0625
T_1 —— T_2 gekuppelt	0,25	0,065

Sie werden verglichen mit den UV-Spektren der oxidierten und reduzierten Form des Metmyoglobins.

3.2.6.3.3. Circulardichroismus

Für die Aufnahme der CD-Spektren wurde das Gerät der Firma Roussel-Jouan (Dichrograph CD 185) verwendet und die Elliptizität Θ (Grad · cm^2 · $Dezimol^{-1}$) zur Bestimmung des Helixgehaltes nach folgender Formel berechnet:

$$\Theta = \frac{3300 \cdot \text{Empfindlichkeit} \cdot 10^{-5} \cdot \text{mRW}}{\text{Schichtdicke (cm)} \cdot \text{Proteinkonz. mg/ml}} \cdot \Delta E\,(\text{mm})$$

Empfindlichkeit : Apparateinstellung

mRW: $\frac{\text{Molekulargewicht}}{\text{Anzahl der Aminosäuren}}$

Schichtdicke: verwendete Küvette

ΔE: Extinktion in mm (abgemessen aus den CD-Kurven)

3.2.6.3.3.1. CD-Kurve von Apomyoglobin

Proteinkonzentration: 0,297 mg/ml

Schichtdicke: 0,02 cm

Empfindlichkeit: $1 \cdot 10^{-5}$

Zeitkonstante: 4

Geschwindigkeit: o.c. · 0,125 · 0,5

$$\Theta = \frac{3300 \cdot 1 \cdot 10^{-5} \cdot 112}{0{,}02 \cdot 0{,}295} \cdot \Delta E = \frac{3{,}69}{0{,}00591} \cdot \Delta E = 624{,}36 \cdot \Delta E$$

nm	mm	Θ
230	16	9989
225	25	15600
220	27	16857
215	27	16857
210	30	18730
205	30	18720

3.2.6.3.3.2. CD-Kurve von Apomyoglobin rekombiniert mit Hämin

Proteinkonzentration: 0,469 mg/ml

Schichtdicke: 0,1 cm

Empfindlichkeit: $2 \cdot 10^{-5}$

Zeitkonstante: 4

Geschwindigkeit: o.c. · 0,25 · 0,5

$$\Theta = \frac{3300 \cdot 2 \cdot 10^{-5} \cdot 112}{0,1 \cdot 0,469} \cdot \Delta E = \frac{7,39}{0,0469} \cdot \Delta E = 157,7 \cdot \Delta E$$

nm	mm	Θ
230	73	11512
225	114	17980

$$\Theta = \frac{3300 \cdot 5 \cdot 10^{-5} \cdot 112}{0,1 \cdot 0,469} \cdot \Delta E = \frac{18,48}{0,0469} \cdot \Delta E = 394 \cdot \Delta E$$

nm	mm	Θ
220	50	19700
215	47	18500
210	47	18500
205	48	18900

3.2.6.3.3.3. CD-Kurve von TFA-Apomyoglobin nach Abspaltung der Schutzgruppe

Proteinkonzentration: 0,0446 mg/ml

Schichtdicke: 0,1 cm

Empfindlichkeit: $1 \cdot 10^{-5}$

Zeitkonstante: 4

Geschwindigkeit: o.c. • 0,125 • 0,5

$$\Theta = \frac{3300 \cdot 1 \cdot 10^{-5} \cdot 112}{0,1 \cdot 0,0446} \cdot \Delta E = \frac{3,69}{0,00446} \cdot \Delta E = 827 \cdot \Delta E$$

nm	mm	Θ
230	11	9091
225	18	14800
220	20	16540
215	19	15713
210	21	17367
205	21	17367

3.2.6.3.3.4. CD-Kurve von TFA-Apomyoglobin rekombiniert mit Hämin nach Abspaltung der Schutzgruppe

Proteinkonzentration: 0,784 mg/ml

Schichtdicke: 0,01 cm

Empfindlichkeit: $1 \cdot 10^{-5}$

Zeitkonstante: 4

Geschwindigkeit: o.c. • 0,125 • 0,5

$$\Theta = \frac{3300 \cdot 1 \cdot 10^{-5} \cdot 112}{0,1 \cdot 0,784} \cdot \Delta E = \frac{3,69}{0,00784} \cdot \Delta E = 471 \cdot \Delta E$$

nm	mm	Θ
230	27	12717
225	37	17400
220	38	17891
215	35	16485
210	36	16956
205	34	16014

3.2.6.3.3.5. CD-Spektrum von TFA-Benzyl.-Apomyoglobin nach Abspaltung der Schutzgruppen

Proteinkonzentration: 0,265 mg/ml

Sichtdicke: 0,1 cm

Empfindlichkeit: $1 \cdot 10^{-5}$

Zeitkonstante: 4

Geschwindigkeit: o.c. · 0,25 · 0,5

$$\Theta = \frac{3300 \cdot 1 \cdot 10^{-5} \cdot 112}{0,1 \cdot 0,265} \cdot \Delta E = \frac{3,69}{0,0265} \cdot \Delta E = 139 \cdot \Delta E$$

nm	mm	Θ
230	60	8340
225	100	13900
220	114	15846
215	100	13900
210	112	15568
205	112	15568

3.2.6.3.3.6. CD-Spektrum von TFA-Benzyl.-Apomyoglobin rekombiniert mit Hämin nach Abspaltung der Schutzgruppen

Proteinkonzentration: 0,1375 mg/ml

Schichtdicke: 0,1 cm

Empfindlichkeit: $1 \cdot 10^{-5}$

Zeitkonstante: 4

Geschwindigkeit: o.c. • 0,25 • 0,5

$$\Theta = \frac{3300 \cdot 1 \cdot 10^{-5} \cdot 112}{0,1 \cdot 0,1375} \cdot \Delta E = \frac{3,69}{0,01375} \cdot \Delta E = 268 \cdot \Delta E$$

nm	mm	Θ
230	38	10184
225	62	16620
220	68	18224
215	68	18224
210	67	17956
205	62	16616

3.2.6.3.3.7. CD-Spektrum von T_1——T_2 gekuppelt

Konzentration: 0,0644 mg/ml

Schichtdicke: 0,1 cm

Empfindlichkeit: $1 \cdot 10^{-5}$

Zeitkonstante: 4

Geschwindigkeit: o.c. • 0,25 • 0,5

$$\Theta = \frac{3300 \cdot 1 \cdot 10^{-5} \cdot 110}{0,1 \cdot 0,0644} \cdot \Delta E = \frac{3,63}{0,00644} \cdot \Delta E = 564 \cdot \Delta E$$

nm	mm	Θ
230	8	4512
225	21	11750
220	23	12912
215	22	12408
210	24	13536
205	23	12912

3.2.6.3.3.8. CD-Spektrum von T_1——T_2 gekuppelt nach Einlagerung von Hämin

Proteinkonzentration: 0,1323 mg/ml

Schichtdicke: 0,05 cm

Empfindlichkeit: $1 \cdot 10^{-5}$

Zeitkonstante: 4

Geschwindigkeit: o.c. · 0,25 · 0,5

$$\Theta = \frac{3300 \cdot 1 \cdot 10^{-5} \cdot 110}{0{,}05 \cdot 0{,}1323} \cdot \Delta E = \frac{3{,}63}{0{,}00616} \cdot \Delta E = 589 \cdot \Delta E$$

nm	mm	Θ
235	7	4123
230	14	8200
225	23	13547
220	24	14136
215	23	13547
210	24	14136
205	20	11780

3.2.7. Produktcharakterisierung

3.2.7.1. Isoelektrische Fokussierung

Liegt bei einer Elektrophorese zwischen Katode und Anode ein pH-Gradient von hohen zu niederen Werten vor, so wandern Proteine in die Zonen ihrer isoelektrischen pH-Werte. Die isoelektrische Fokussierung ermöglicht eine Proteincharakterisierung ohne Vorreinigung und da dabei eine starke Konzentrierung in schmale Zonen auftritt, liegt die Nachweisgrenze bei 2 µg/ml. Myoglobin, rekombiniertes TFA-Apomyoglobin, rekombiniertes TFA-Benzyl-Apomyogrobin und rekombiniertes gekuppeltes T_1 —— T_2 werden nach Abspaltung ihrer Schutzgruppen durch isoelektrische Fokussierung charakterisiert.

Zur Elektrofokussierung wird die 110 ml Säule der LKB 8100 Ampholine Elektrofokussierausrüstung verwendet.

Die untere Elektrode (Anode) wird mit der Lösung von 12 g Saccharose und 0,2 g H_2SO_4 in 14 ml Wasser gefüllt. Die schwere Lösung des Dichtegradienten enthält in 34 ml Wasser 22,4 g Saccharose und 0,75 ml Ampholyt pH 5-8. Die leichte Lösung enthält das Myoglobin in 20 ml Wasser. Mit einigen Tropfen 0,1 % $K_3Fe(CN)_6$-Lösung und 2 % KCN-Lösung werden die Hämoproteide in die Fe(III)-

CN-Form umgesetzt. Die Fe(II)-Form ist weniger stabil und sehr oxidationsempfindlich. Zu dieser Lösung wird 0,25 ml Ampholyt pH 5-8 gegeben und mit Wasser auf 45 ml aufgefüllt. Nachdem der Gradientenmischer in die Säule ausgelaufen ist, wird er mit 5 ml 0,4 % Ampholytlösung (1 ml käufliche Lösung + 99 ml Wasser) nachgespült. Die Lösung wird in der Säule über den Dichtegradienten geschichtet. Der obere Elektrodenraum (Katode) wird mit 1 % NaOH aufgefüllt. An die Säule wird eine Spannungsquelle 400 V 100 mA angeschlossen.

Der Verlauf der Fokussierung ist optisch sehr gut kontrollierbar. Nach der Trennung wird die untere Elektrode verschlossen, der Säuleninhalt wird mit einer peristaltischen Pumpe durch ein Spektralphotometer gesaugt und mittels des Fraktionssammlers in kleinen Mengen aufgefangen. Von jeder Fraktion wird der pH bestimmt. (164 - 167)

Versuch 1

42 mg Myoglobin werden fokussiert.

Isoelektrischer Punkt: pH 6,1 - 6,9

Quantitative Bestimmung vom fokussierten Myoglobin: 13 mg

Versuch 2

43,2 mg Apomyoglobin + Hämin werden fokussiert.

Isoelektrischer Punkt: pH 5,9 - 6,7

Quantitative Bestimmung vom fokussierten Myoglobin: 6 mg

Versuch 3

50,4 mg Apomyoglobin + Hämin werden mit Trypsin behandelt und dann fokussiert.

Isoelektrischer Punkt: 5,9 - 6,7

Quantitative Bestimmung vom fokussierten Myoglobin: 4 mg

Versuch 4

50,4 mg Apomyoglobin werden mit Trypsin behandelt und nach Zugabe von Hämin fokussiert.

Ergebnis: Es konnte keine Myoglobinbande isoliert werden.

Versuch 5

26 mg 8 Tage altes Apomyoglobin wurde nach Zugabe von Hämin fokussiert.

Ergebnis: Es konnte keine Myoglobinbande isoliert werden. Die braune Bande wanderte zur Anode und flockte dort aus. Auch ein Versuch zur Renaturierung in 6 m Guanidinhydrochlorid brachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

Versuch 6

87,5 mg TFA-Apomyoglobin + Hämin werden nach Abspaltung der TFA-Gruppen fokussiert.

Ergebnis: Braune Bande wandert zur Anode; eine Isolierung war nicht möglich, da das Produkt im Sauren ausfällt.

Versuch 7

140 mg verestertes TFA-Apomyoglobin + Hämin wird nach Abspaltung der Schutzgruppen fokussiert.

Ergebnis: Rote Bande wandert zur Anode und fällt dort aus.

Versuch 8

8 mg T_1 —— T_2-gekuppelt werden fokussiert.

Ergebnis: Auch hier konnte keine Myoglobinbande isoliert werden.

3.7.2. Diskelektrophorese

Mit Hilfe der Diskelektrophorese soll die Identität von Apomyoglobin, TFA-Apomyoglobin und TFA-Benzyl.-Apomyoglobin nach Abspaltung der Schutzgruppen bewiesen werden. (168)

Standardgel: 7 % (üH 8,9)

Stammlösungen:

A)	1 n HCl	24 ml	B)	1 n HCl	48 ml
	Tris	18,1 g		Tris	5,98 g
	Temed	0,12 ml		Temed	0,46 ml
	Mit Wasser auf	100 ml		Mit Wasser auf	100 ml
	aufgefüllt			aufgefüllt	

C) Acrylamid 28,0 g
Bis 0,735 g
Mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt

D) Acrylamid 20 g
Bis 5 g
Mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt

E) Riboflavin 4,0 mg
Mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt

F) Sucrose 40 g
Mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt

G) Katalysator
Ammoniumpersulfat 0,14 g
Mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt

H) Puffer 10 x (wie verwendet)
Tris 3 g
Glycin 14,4 g
Mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt

I) Färbemittel (wie verwendet)
Anilin-Schwarz 1 g
Mit 7 % Essigsäure auf 200 ml aufgefüllt

J) Markierungsfarbstoff
0,005 % Bromphenolblaulösung

Abkürzungen

Tris: 2-Amino-2-Hydroxymethyl-1-3-Propandiol

Bis: N,N'-Methylenbiacrylamid

Temed: N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamid

Verwendetes Trenngel	Verwendetes Schichtgel
1 Teil A	1 Teil B
1 Teil B	1 Teil D
2 Teile G	1 Teil E
	1 Teil Wasser
	4 Teile F

Die Diskelektrophoreseröhrchen werden zu 2/3 mit Trenngel gefüllt. Nach 30 Minuten Polymerisationszeit folgt eine 1 cm hohe Schicht Stacking Gel, das zur Polymerisation 30 Minuten UV-Licht benötigt. Anschließend wird je 0,025 mg Apomyoglobin, TFA-Apomyoglobin und TFA-Benzyl.-Apomyoglobin nach Abspaltung ihrer Schutzgruppen in 0,1 ml 40 % Sucroselösung gelöst und auf das Stacking Gel aufgetragen. Die Pufferlösung wird mit 0,005 % Bromphenolblau schwach violett gefärbt, um einen Anhaltspunkt über die Wanderungsgeschwindigkeit zu haben. Sind die Bromphenolbanden am Ende der Röhrchen angelangt, so werden die Gele aus den Röhrchen herausgelöst und 1 Stunde zur Färbung der Zonen in eine Anilinschwarzlösung gelegt. Zum Entfernen der überschüssigen Farbe werden die Gele 12 Stunden mit 7 % Essigsäure gespült.

Mit dieser Methode konnte die Identität der untersuchten Proteine bewiesen werden.

4. Zusammenfassung

Da die Darstellung längerer Peptide und Proteine mit Hilfe der Totalsynthese wegen des enormen Zeitaufwands und der technischen Schwierigkeiten bis heute noch ein Problem darstellt, wurde in dieser Arbeit untersucht, in wie weit die Semisynthesetechnik, d.h. die Verwendung natürlicher Proteinfragmente als fertige Zwischenprodukte der Synthese, zur Lösung dieses Problems herangezogen werden kann.

Für die Semisyntheseversuche wurden die beiden Proteine Ferredoxin aus Clostridium acidi urici und Pferdemyoglobin deshalb gewählt, da es zum einen in beiden Fällen durch die Anwesenheit von wenig Argininresten möglich ist, tryptische Fragmentpeptide zu erhalten, zum anderen das Gelingen der Semisynthese anhand der typischen Resynthesefähigkeit und der biologischen Aktivität der beiden Proteine verfolgt werden kann.

Zunächst wurde versucht, mit Hilfe der Semisynthesetechnik

- Darstellung geeigneter, natürlicher Fragmente
- Kupplung der Fragmente
- Resynthese

Clostridienferredoxin, ein Stickstoff-fixierendes, eisenhaltiges Elektronentransportprotein, bestehend aus 55 Aminosäuren, zu synthetisieren.

Als Ausgangsprodukt zur Darstellung natürlicher Fragmente diente Apoferredoxin, das durch Entfernen der prosthetischen Gruppe mit Trichloressigsäure aus Ferredoxin in guter Ausbeute gewonnen werden konnte.
Die nächste Aufgabe war nun, die reaktiven SH-Gruppen der 8 Cysteinreste im Protein wegen ihrer leichten Oxidierbarkeit zu unerwünschten Disulfidbrücken selektiv und reversibel zu blockieren, wobei die S-Sulfonierung sowohl mit Na_2SO_3 + $CuSO_4$ als auch mit Na_2SO_3 + Cystein hervorragende Ergebnisse erzielte. Der quantitative Verlauf der Reaktion konnte mittels radioaktiver Markierung (S^{35}) bestätigt werden. Die reversible Blockierung zeigte der Resyntheseversuch, bei dem nach Zugabe von Mercaptoäthanol, Fe^{3+} und Sulfid zu 60 % natives Ferredoxin erhalten werden konnte.

Das reversible S-sulfonierte Apoferredoxin, das keine Lysinreste und nur einen Argininrest enthält, wurde nun mit Trypsin gespalten. Da dieses Enzym ein Höchstmaß an Spezifität in der Katalyse der Peptidbindungsspaltung besitzt, konnten 2 definierte Proteinfragmente erhalten werden. So lieferte zum einen der Carboxypeptidasetest die gleiche Menge Arginin wie die Totalhydrolyse, zum anderen zeigte das DC-Chromatogramm des Edman-Abbaus nur 2 N-terminale Aminosäuren, nämlich Alanin und Tyrosin.

Um eine gezielte Kupplung der beiden Fragmente durchführen zu können, müssen auch die restlichen funktionellen Gruppen der Aminosäurereste durch Benzylgruppen blockiert werden. Da jedoch zum einen die Abspaltungsreagenzien HBr in Trifluoressigsäure und Fluorwasserstoff eine irreversible Denaturierung des Proteins zur Folge hatten, zum anderen die beiden Fragmente nach Abspaltung der S-Schutzgruppen auch ohne Kupplung in der Lage waren, Ferredoxin zu 49 % zu resynthetisieren, konnten die grundlegenden Untersuchungen eines Semisyntheseweges an diesem Protein nicht vollständig durchgeführt werden.

Das als nächstes untersuchte Protein, Pferdemyoglobin, erwies sich als bedeutend stabiler gegenüber den obenverwendeten Abspaltungsreagenzien. Es ist ein biologisch aktives Protein mit 153 Aminosäuren, das unter Mitwirkung der Eisen enthaltenden Gruppe Hämin reversibel Sauerstoff zu binden vermag.

Auch hier wurde zunächst durch Entfernen der Hämingruppe im sauren Medium das Apoprotein dargestellt, dessen reaktive Seitengruppen durch die Aufhebung der Wechselwirkungen zwischen Globin und Hämin leichter blockiert werden können.

Als beste Aminoschutzgruppe erwies sich die Trifluoracetylierung, mit deren Hilfe die N-terminale α-Aminogruppe und die ε-Aminogruppen der 20 Lysinreste im Protein reversibel

blockiert werden konnten. Wie durch die Fluoranalyse deutlich wurde, gelingt auch die Abspaltung dieser Schutzgruppe mit Piperidin quantitativ. Vor allem wichtig war die vollständige Blockierung der Lysinreste, da nur dadurch eine selektive Spaltung an den beiden Argininresten des Moleküls gewährleistet war. So konnten 3 definierte Bruchstücke TFA-T_1 (1 - 31), TFA-T_2 (32 - 139) und TFA-T_3 (140 - 153) gewonnen und mit Hilfe der Säulenchromatographie anhand ihres unterschiedlichen Molekulargewichts getrennt isoliert werden.

Die Blockierung der freien Carboxyl-Gruppen, die für eine gezielte Kupplung Vorraussetzung ist, konnte durch die Überführung in die Benzylester erreicht werden, was sowohl mit Phenyldiazomethan als auch mit Benzylchlorid und Tetraäthylammoniumhydroxid gelang.
Die Blockierung der Carboxyl-Gruppen wird deshalb an den Fragmenten und nicht am Gesamtprotein durchgeführt, da das vollblockierte Gesamtprotein in keinem Lösungsmittel löslich war, in dem Trypsin aktiv ist.

Der nächste Schritt bei der Semisynthese von Myoglobin war die Kupplung der vollblockierten Fragmente T_1 und T_2 nach dem DCC/OH Succ-Verfahren. Vom T_1, das die COOH-Komponente bei der Kupplung darstellt, konnte der Benzylester von der COOH-endständigen Aminosäure Arginin selektiv durch Trypsin abgespalten werden.

Vom gekuppelten gereinigten Produkt, das theoretisch 90 % des Gesamtproteins und 94 % des Gesamthelixgehaltes besitzt, wurden die Schutzgruppen mit Piperidin und Fluorwasserstoff quantitativ entfernt und die biologische Aktivität anhand der Rekombinationsfähigkeit mit Hämin bewiesen.

So zeigt das gekuppelte Produkt einen sehr hohen Helixgehalt von 37,9 %, der nach Einlagerung von Hämin auf 43,4 %, das entspricht 81 % des Gesamthelixgehaltes, erhöht werden konnte. Die Änderung der Soretbande bei 410 nm gibt die 1 : 1 Komplexbindung an. Als letztes konnte die richtige Einlagerung von Hämin, bei der die 5. Koordinationsstelle des Porphyrinringsystems durch den F-8-Proteinhistidinrest eingenommen wird, und die 6. Koordinationsstelle frei ist für die reversible Aufnahme von O_2, anhand der typischen high-spin Fe^{2+}-Spektren (600 - 450 nm) bewiesen werden.

Als Hauptprobleme bei diesen Semisyntheseversuchen erwiesen sich sowohl die Darstellung und Isolierung geeigneter Fragmentpeptide aus dem Gesamtprotein als auch die Einführung peptidschonender, reversibler Schutzgruppen in sämtliche reaktive Seitengruppen der Peptidketten, die ja nötig ist für eine gezielte Kupplung der Fragmente.

5. Literaturverzeichnis

1.) Wünsch, E.,
Z. Natforsch. 22 b, 1269 (1967)

2.) Wünsch, E., Wendelberger, G., Jaeger, E., Scharf, R.,
Peptides, Proc. Europ. Peptide Sympos., Orsay 1968, S. 229, North Holland Publ., Amsterdam 1968

3.) Rittel, W., Brugger, U., Kamber, B., Riniker, B., Sieber, P.,
Helv. Chim. A. 51, 2057 (1968)

4.) Weygand, F., Steglich, W., Bjarnason, J.,
Tetrahedron Lett. 3483 (1966)

5.) Wünsch, E.,
Ang. Chem. 20, 773 (1971)

6.) Denkewalter, R.G., Schwanz, H., Strachan, R.G., Beesley, T.E., Veber, D.F., Schoenewaldt, E.F., Borkemeyer, H., Paleveda, W.J., Jacob, T.A., Hirschmann, R.,
J. Am. Chem. Soc. 88, 3163 (1966)

7.) Hirschmann, R. et al.,
J. org. Chem. 32, 3415 (1967)

8.) Merrifield, R.B.,
J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)

9.) Marshall, G.R., Merrifield, R.B.,
Biochemistry 4, 2396 (1965)

10.) Bayer, E., Eckstein, H., Hägele, K., König, W.A., Brüning, W., Hagenmaier, H., Parr, W.,
J. Am. Chem. Soc. 92, 1735 (1970)

11.) Gutte, B., Merrifield, R.B.,
J. Am. Chem. Soc. 91, 501 (1969)

12.) Dixon, H.B.F., Weitkamp, L.R.,
Biochem. J. 84, 462 (1962)

13.) Polgar, L., Bender, M.,
Biochemistry 6, 610 (1967)

14.) Offord, R.E.,
Nat. 221, 37 (1969)

15.) Panayotis, G., Katsoyannis, Anthony, C., Trakatellis,
Biochemistry 6, 2656 (1967)

16.) Lande, S., Burton, J.,
Peptides 1969, p. 109, North-Holland Publishing Comp. (1971)

17.) Offord, R.E.,
Biochem. J. 129, 499 (1972)

18.) Backer, T.A., Offord, R.E.,
Biochem. J. 110, 3 p (1968)

19.) Levy, D., Carpenter, F.H.,
J. Am. Chem. Soc. 89, 3559 (1967)

20.) Tanaka, M., Nakashima, T., Benson, A. Mower, H., Yasunobu, K.T.,
Biochemistry 5, 1666 (1966)

21.) Rall, S.C., Bolinger, R.E., Cole, R.D.,
Biochemistry 8, 2486 (1969)

22.) Mortenson, L.E., Valentine, R.C., Carnahan, J.E.,
Biochem. biophys. res. Comm. 7, 448 (1962)

23.) Valentine, R.C., Mortenson, L.E., Carnahan, J.E.,
J. Biol. Chem. 238, 1141 (1962)

24.) Carnahan, J.E., Castle, J.E.,
Ann. Rev. Pl. Physiol. 14, 125 (1963)

25.) Mahler, H.R., Cordes, E.H.,
Biological Chemistry, Harper and Row Publishers, New York/London 1966

26.) Mortenson, L.E.,
Fed. Proc. 20, 234 (1961)

27.) Mortenson, L.E., Mower, H.F., Carnahan, J.E.,
Bact. Rev. 26, 42 (1962)

28.) Mortenson, L.E.,
The Bacteria III, p. 119
(Gunsalus, J.C., Stanier, R.Y.,
Academic Press Inc., New York 1962)

29.) Chem. Eng. Ne. 30, 32 (1967)

30.) Hagenmaier, H.,
Habilitationsschrift, Uni Tübingen (1969)

31.) Brill, W.J., Wolfe, R.S.,
Fed. Proc. 24, 233 (1965)

32.) Buchanan, B.B.,
Structure and Bonding 1, 109 (1966)

33.) Hagenmaier, H., Schneider, G.,
unveröffentl. Arbeit, Uni Tübingen

34.) Mortenson, L.E., Valentine, R.C., Carnahan, J.E.,
Biochem. biophys. res. Comm. 7, 448 (1962)

35.) Mortenson, L.E., Valentine, R.C., Carnahan, J.E.,
J. Biol. Chem. 238, 794 (1963)

36.) Haber, E., Anfinsen, C.B.,
J. Biol. Chem. 236, 422 (1961)

37.) Hong, J., Rabinowitz, J.C.,
J. Biol. Chem. 245, 4982 (1970)

38.) Hong, J., Rabinowitz, J.C.,
Biochem. biophys. res. Comm. 29, 246 (1967)

39.) Hong, J., Rabinowitz, J.C.,
J. Biol. Chem. 245, 6574 (1970)

40.) Sela, M., White, F.H., Anfinsen, C.B.,
Biochim. biophys. A. 31, 417 (1959)

41.) White, F.H.,
J. Biol. Chem. 235, 383 (1960)

42.) White, F.H.,
J. Biol. Chem. 236, 1353 (1961)

43.) White, F.H., Anfinsen, C.B.,
Ann. NY Ac. Sci. 81, 515 (1959)

44.) Anfinsen, C.B., Haber, E.,
J. Biol. Chem. 236, 1361 (1961)

45.) Brumby, P.E., Miller, R.W., Massey, V.,
J. Biol. Chem. 240, 2222 (1965)

46.) Hong, J., Rabinowitz, J.C.,
J. Biol. Chem. 245, 6582 (1970)

47.) Lovenberg, W., Buchanan, B.B., Rabinowitz, J.C.,
J. Biol. Chem. 238, 3899 (1963)

48.) Hong, J., Rabinowitz, J.C.,
J. Biol. Chem. 245, 4995 (1970)

49.) Cunningham, L.W., Nuenke, B.J.,
J. Biol. Chem. 234, 1447 (1959)

50.) Glazer, A.N.,
Spezific chemical Modification of Proteins, p. 107,
Department of Biological Chemistry, UCLA, School of Medicine and Institute of Molecular Biology, University of California, Los Angeles, California

51.) Heinrikson, R.L.,
J. Biol. Chem. 246, 4090 (1971)

52.) Cole, R.D., in Hirs, C.H.W. Methods of Enzymology XI, p. 206, Academic Press New York/London 1967

53.) Bailey, J.L., Cole, R.D.,
J. Biol. Chem. 234, 1733 (1959)

54.) Chan, W.W.C.,
Biochemistry 7, 4247 (1968)

55.) Mc Phee, J.R.,
Biochem. J. 64, 22 (1965)

56.) Hong, J., Rabinowitz, J.C.,
J. Biol. Chem. 245, 4988 (1970)

57.) Orme-Johnson, W.H.,
Abstract Communications, Joint Meeting of the Biochemical Molecular Enzymolog. Group and the British Biophysical Society, MagdalenCollege, Oxford, 4 - 7 September 1972
Department of Biochemistry and Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin Madison, Wis. 53706 USA

58.) Nobbs, C.L., Watson, H.C., Kendrew, J.C.,
Nat. 209, 339 (1966)

59.) Brill, A.S., Williams, R.J.P.,
Biochem. J. 78, 246 (1961)

60.) Smyth, D.G., in Hirs, C.H.W. Methods of Enzymology XI, p. 220, Academic Press New York/London 1967

61.) Jakubke, H.D., Jeschkeit, H., Aminosäuren, Peptide, Proteine, Akademie-Verlag, Berlin 1973, p. 97

62.) Theorell, H., Acta Chem. Scand. 5, 371 (1951)

63.) Harrison, S.C., Blout, E.R., J. Biol. Chem. 240, 299 (1965)

64.) Katz, S., Denis, J., Biochim. Biophys. A. 207, 331 (1970)

65.) Theorell, H., Akeson, A., Ann. Ac. Sci. Fenn. 60, 303 (1955)

66.) Weygand, F., Bull Soc. Chim. Biol. 43, 1269 (1961)

67.) Goldberger, R.F., in Hirs, C.H.W. Methods of Enzymology XI, p. 318, Academic Pres, New York/London 1967

68.) Epand, R.M., Scheraga, H.A., Biochemistry 7, 2864 (1968)

69.) Epstein, C.J., Goldberger, R.F., Anfinsen, C.B., Cold Spring Habor Symposia on quantitative biology Vol. 28, Long Island, Biological Association, Cold Spring Habor New York 1963, p. 439

70.) Blout, E.R., in Stahmann, M.A., Polyamino acids, polypeptides and Proteins, University of Wisconsin, Press Madison 1962, p. 275

71.) Redfield, R.R., Anfinsen, C.B., J. Biol. Chem. 221, 385 (1956)

72.) Anfinsen, C.B., Sela, M., Arch. Bioch. 65, 156 (1956)

73.) Merigan, T.C., Dreyer, W.J., Biochim. biophys. A. 62, 122 (1962)

74.) Goldberger, R.F., Anfinsen, C.B., Biochemistry 1, 401 (1962)

75.) Steinhardt, J.,
J. Biol. Chem. 123, 543 (1938)

76.) Hermans, J., Puett, D., Acampora, G.,
Biochemistry 8, 22 (1969)

77.) Anson, M.L., Mirsky, A.E.,
J. gen. Physiol. 13, 121 (1929)

78.) Schröder, E., Lübke, K.,
in The Peptides, New York/London, Academic Press
1966

79.) Fischer, E.,
Ber. dt. chem. Ges. 39, 2893 (1906)

80.) Bergmann, M.,
Ber. dt. chem. Ges. 66, 1288 (1933)

81.) Bergmann, M.,
J. Biol. Chem. 111, 245 (1935)

82.) Cipera, J.D., Nicholls, R.V.V.,
Chem. Ind. 1, 16 (1955)

83.) Hayward, C.F., Offord, R.E.,
Peptides 116 (1969)

84.) Sarin, P.S., Fasman, G.D.,
Biochim. biophys. A. 82, 175 (1964)

85.) Nenitzescu, C.D., Solomonica, E.,
Org. Synth. 2, 496 (1963)

86.) Hill, R.L., Schmidt, W.R.,
J. Biol. Chem. 237, 389 (1962)

87.) Atassi, M.Z., Cacciotti, L.R.,
Nat. 209, 1211 (1966)

88.) Wagenknecht, J.H., Baizer, M.M., Chruma, J.L.,
Synthetic communications 2, 215 (1972)

89.) Troitskaya, O.V.,
Biokhimiya 31, 605 (1966)

90.) Edmundson, A.B.,
Nat. 198, 354 (1963)

91.) Mueller,
Zeitschrift für medizinische Labortechnik 7, 234 (1966)

92.) Curtius, Th.,
Ber. dt. chem. Ges. 35, 3226 (1902)

93.) Hegedüs, B.,
Helv. Chim. A. 31, 737 (1948)

94.) Sornn, F., Rudinger,
J. Coll. Czech. Chem. Comm. 15, 491 (1950)

95.) Rowlands, D.A.,
J. Chem. Soc. 3, 3937 (1952)

96.) Sachs, H., Brand, E.,
J. Am. Chem. Soc. 76, 1815 (1954)

97.) Kisfaludy, L.,
Acta chim. Acad. Sci. hung. 24, 309 (1960)

98.) Brimacombe, J.S.,
Ang. Chem. 83, 261 (1971)

99.) Havsteen, B.H., Hess, G.P.,
J. Am. Chem. Soc. 84, 491 (1962)

100.) Koshland, D.E.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 98 (1958)

101.) Dautrevaux, M., Boulanger, Y., Hank, Moschetto,
Y., Biserte, G.,
Europ. J. Biochem. 11, 267 (1969)

102.) Hermans, J.,
Biopolymers 10, 895 (1971)

103.) Brahms, J., Spach, G.,
Nat. 200, 72 (1963)

104.) Myer, Yash, P.,
Comm. Chem. Path. Pharm. 1, 607 (1970)

105.) Saxena, V.P.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 969 (1971)

106.) Behlke, J., Scheler, W.,
Acta biol. med. Ger. 12, 629 (1964)

107.) Rumen, N., Appella, E.,
Arch. Bioch. 97, 128 (1962)

108.) Hermans, J., Rialdi, G.,
Biochemistry 4, 1277 (1965)

109.) Simmons, N.S., Cohen, C., Szent-Gyorgyi, A.G.,
Wetlaufer, D.B., Blout, E.R.,
J. Am. Chem. Soc. 83, 4766 (1961)

110.) Cary, H., Hawes, R.C., Hooper, P.B., Duffield,
J.J., George, K.P.,
Applied optics 3, 329 (1964)

111.) Shetcher, E., Blout, E.R.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 695 (1964)

112.) Shetcher, E., Blout, E.R.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 794 (1964)

113.) Shetcher, E., Carver, J.P.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 1029 (1964)

114.) Blout, E.R., Schmier, J., Simmons, N.S.,
J. Am. Chem. Soc. 84, 3193 (1962)

115.) Urnes, P.J., Imahori, K., Doty, P.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 1635 (1961)

116.) Volkenshtein, M.V.,
Biokhimiya 30, 148 (1965)

117.) Harrison, S.C., Blout, E.R.,
J. Biol. Chem. 240, 299 (1965)

118.) Atanosow, B.P.,
J. molec. Biol. 4, 51 (1970)

119.) Sajgó, M.,
J. molec. Biol. 7, 752 (1963)

120.) Breslow, E.,
J. Biol. Chem. 237, 3307 (1962)

121.) Breslow, E., Gurd, F.R.N.,
J. Biol. Chem. 237, 371 (1962)

122.) Banaszak, L.J., Andrews, P.A., Burgner, J.W.,
Eylar, E.H., Gurd, F.R.N.,
J. Biol. Chem. 238, 3307 (1963)

123.) Breslow, E.,
J. Biol. Chem. 239, 486 (1964)

124.) Breslow, E.,
J. Biol. Chem. 237, p.c. 3308 (1962)

125.) Crumpton, M.J.,
J. molec. Biol. 11, 722 (1965)

126.) Breslow, E., Beychok, S., Hardman, K.D., Gurd, F.R.N.,
J. Biol. Chem. 240, 304 (1965)

127.) Watson, C.J.,
Hemes and Hemoproteins, p. 63 (Ed. Britton Chanoe, New York/London, Academic Press 1966)

128.) Beychok, S., Blout, E.R.,
J. molec. Biol. 3, 769 (1964)

129.) Gibson, Q.H., Antonini, E.,
J. Biol. Chem. 239, 3282 (1964)

130.) Breslow, E., Koehler, R., Girotti, A.W.,
J. Biol. Chem. 242, 4149 (1967)

131.) Crumpton, M.J., Small, P.A.,
J. molec. Biol. 26, 143 (1967)

132.) Crumpton, M.J.,
Biochem. J. 108, 18 P (1968)

133.) Kendrew, J.C., Brookhaven Symposia in biology 15, 216 (1962)

134.) Acampora, G., Hermans, J.,
J. Am. Chem. Soc. 89, 1543 (1967)

135.) Hermans, J.,
Meth. bioch. Anal. 13, 81 (1965)

136.) Anfinsen, C.B., Brookhäven Symposia in biology 15, 184 (1962)

137.) Kendrew, J.C., Watson, H.C., Strandberg, B.E., Dickerson, R.E., Phillips, D.C., Shore, V.C.,
Nat. 190, 666 (1961)

138.) Breslow, E., Koehler, R.,
J. Biol. Chem. 240, PC 2266 (1965)

139.) Hill, R., Holden, H.F.,
Biochem. J. 20, 1326 (1926)

140.) Rossi-Fanelli, A., Antonini, E., Caputo, A.,
Biochim. biophys. A. 35, 93 (1959)

141.) Schlechter, Epstein,
J. molec. Biol. 35, 567 (1968)

142.) Herskovits, T.T.,
Arch. Bioch. 130, 19 (1965)

143.) Perutz, M.F.,
Proc. Ray. Soc. (London) A 195, 474 (1949)

144.) Brill, A.S., Williams, R.J.P.,
Biochem. J. 78, 246 (1961)

145.) Pauling, L.,
J. Am. Chem. Soc. 53, 1367 (1931)

146.) Lang, G.,
J. Appl. Phys. 38, 915 (1967)

147.) Williams, R.J.P.,
Symposium on Haematin Enzymes, Canberra (1959 b),
Pergamon Press Ltd.

148.) Van Vleck, J.H.,
J. chem. phys. 3, 807 (1935)

149.) Williams, R.J.P., in The Enzymes, Ed. by Bayer,
P.D., Lardy, H., Myrbück, K., New York, Academic Press Inc. (1959 a)

150.) Williams, R.J.P.,
Chem. Rev. 56, 299 (1956)

151.) Mauzerall, D.,
Biochemistry 4, 1801 (1965)

152.) Longuet, Higgins, H.C., Rector, C.W., Platt, J.R.,
J. chem. phys. 18, 1174 (1950)

153.) Ray, D.K., Gurd, F.R.N.,
J. Biol. Chem. 242, 2062 (1967)

154.) Kinzaburo,
Journ. Biochem. 52, 374 (1962)

155.) Beyer, R.,
Acta biol. med. Ger. 24, 805 (1970)

156.) Beyer, R., Stremmel, D.,
Acta biol. med. Ger. 24, 805 (1970)

157.) Masao Kotani,
Advances in Chem. phys. Vol. II, Department of Physics, Faculty of Science, University of Tokyo

158.) Anson, M.L.,
J. gen. Physiol. 23, 239 (1939)

159.) Kromphardt, H.,
Biochem. Z. 330, 342 (1958)

160.) Griffith, J.S.,
Discuss Farad. Soc. 26, 81 (1958)

161.) Pfau, A.,
Nat. Wiss. 53, 225 (1966)

162.) Geltner, D.,
Chem. Abstr. 40, 6276 (1946)

163.) Merz, D., Determann, H.,
Anal. Chem. 728, 216 (1969)

164.) Quinn, J.R.,
Journal of Chromatography 76, 520 (1973)

165.) Vesterberg, O., Svensson, H.,
Acta chem. scand. 20, 820 (1966)

166.) Vesterberg, O.,
Acta chem. scand. 21, 206 (1967)

167.) Herbertz, G.,
Z. Anal. Chem. 260, 124 (1972)

168.) Canal Industrial Corporation, 5635 Fisher Lane, Rockville, Md. 20852, USA

Lebenslauf

21.9.1945	Geburt in Ulm als Tochter des Bundesbahn-Oberinspektors Oskar Zartner und seiner Ehefrau Eugenie, geb. Fritzsching
1952-1956	Volksschule in Kornwestheim und Ulm
1956-1965	Besuch des humanistischen Gymnasiums in Ulm
1965	Abitur
1965-1967	Studium der Chemie und Biologie an der Universität Tübingen
1967	Vordiplomprüfung in Biologie
1967-1968	Studium der Chemie und Biologie an der Universität München
1968-1969	Studium an der Universität Tübingen
1969	Diplomprüfung in Biologie
1969-1970	Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. H.Metzner
1971	Staatsexamen in Chemie und Biologie
1970-1973	experimentelle Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. H. Hagenmaier

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren H.Autrum, E.Bayer, H.Becker, E.Bünning, R.Gompper, R.Huisgen, F.Klages, F.Lynen, H.Metzner, F.Möhres, E.Müller, W.Rüdorff, G.Schwab.

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Forststr. 58
Telefon (0711) 61 06 41 / 42

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Forststr. 58
Telefon (0711) 61 06 41 / 42